

Festphasenbasierte Synthese von derivatisierten Peptiden als potentielle Inhibitoren der miRNA-Reifung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Christiane Schöniger

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Christoph Arenz

2. Prof. Dr. Christian Hackenberger

Tag der mündlichen Prüfung:

09.11.2016

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	iii
Abstract	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Stand der Forschung	1
1.1 Biogenese der miRNA und die post-transkriptionale Genregulation durch miRNAs	1
1.2 miRNAs und Krankheiten.....	2
1.3 Inhibition der miRNA.....	3
1.3.1 Inhibition durch sequenzspezifische Adressierung	3
1.3.2 Inhibition der miRNA-Biogenese durch small molecules.....	5
1.3.3 Aminoglykoside als Binder von RNA-Strukturen und prä-miRNAs.....	6
1.4 Peptide – Synthese und chemische Modifikation	10
1.4.1 Festphasenpeptidsynthese	10
1.4.2 Methoden der Biokonjugation zur Modifikation von Peptiden.....	12
1.4.3 Glykosylierungen an Peptiden.....	14
1.4.4 Zyklisierungsreaktionen an Peptiden	15
1.4.5 Peptide und Peptoide als Binder von prä-miRNA	19
1.5 Guanidine an Peptiden und Aminoglykosiden.....	20
2 Zielstellung	25
3 Ergebnisse und Diskussion.....	29
3.1 Synthese nicht natürlicher Aminosäuren	29
3.2 Synthese von 3-Azido-Neamin und 3-Azido-Neomycin	34
3.3 Synthese von stabilisierenden Liganden in der CuAAC	35
3.4 Synthese zyklischer Peptide an fester Phase	36
3.5 Modifikation von Peptiden mit Guanidinen als chemisches Werkzeug	42
3.6 Guanidinylierung von Triazolgebundenen Aminoglykosiden an fester Phase.....	45
3.6.1 Fluorophormarkierte Guanidinoneomycin-Konjugate.....	49
3.6.2 Guanidinylierte Neomycin-Peptid-Konjugate als potentielle CPPs.....	54
3.7 Effizientes Harz-Design für Peptidscreeningmethoden	55
4 Zusammenfassung und Ausblick	59
5 Experimenteller Teil	63
5.1 Methoden und Materialien	63
5.1.1 Chemikalien	63
5.1.2 Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie	64
5.1.3 NMR-Spektroskopie	64
5.1.4 ESI-HRMS	64
5.1.5 UPLC-MS.....	64
5.1.6 Semi-präparative HPLC	65

5.1.7	UV-VIS-Spektroskopie	65
5.1.8	MALDI-TOF	66
5.2	Synthese der Reagenzien.....	66
5.2.1	N-9-Anthracylmethylcinchonidinumchlorid	66
5.2.2	O-(9)-Allyl-N-(9)-anthracylmethylcinchonidiniumbromid	67
5.2.3	N-Benzophenon-glycin-imin-tert-butylester.....	68
5.2.4	(S)-N-Benzophenon-propargylglycin-imin-tert-butylester	69
5.2.5	N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin.....	70
5.2.6	Diethyl-2-acetamido-2-propinylmalonat	71
5.2.7	N-Acetylpropargylglycin.....	71
5.2.8	L-Propargylglycin	72
5.2.9	N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin.....	72
5.2.10	Pent-4-inylmethansulfonat.....	73
5.2.11	Neamin Tetrahydrochlorid	74
5.2.12	Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid.....	74
5.2.13	3-Azido-Neomycin	75
5.2.14	3-Azido-Neamin	76
5.2.15	Benzylazid.....	77
5.2.16	Tris[benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin TBTA	77
5.2.17	3-Azido-propan-1-ol	78
5.2.18	Tris[(1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin THPTA.....	78
5.2.19	N,N'-Di-chloracetyl-2,6-diaminopyridin	79
5.2.20	N,N'-Di-tert-Butyloxycarbonyl-N''-triflylguanidin	80
5.2.21	3-Azido-(1,2',6',2'',6'''-penta(di-tert-butyloxycarbonylguanidino))neomycin	81
5.2.22	[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanazid	82
5.2.23	N-([2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanazid)-5(6)-Fluoresceinamid	82
5.3	Synthesevorschriften für die Festphasenpeptidsynthesen	83
5.3.1	Verwendete Harze	83
5.3.2	Verwendete Aminosäuren und PNA-Monomere	83
5.3.3	Allgemeine Vorschrift zur manuellen Festphasenpeptidsynthese	83
5.4	Synthese der Peptide	87
6	Literatur	101
	Anhang.....	107
	Publikationen.....	161
	Eidesstattliche Erklärung	166
	Danksagung.....	168

Kurzfassung

Mikro-RNAs (miRNA) sind kurze 21 – 23 nukleotidlange nicht kodierende RNAs endogenen Ursprungs und regulieren auf post-transkriptionaler Ebene die Genexpression. Ausgehend im Zellkern werden primäre Transkripte zu Präkursor-miRNAs prozessiert und reifen nach Transport ins Cytosol zu reifen miRNAs heran. Da aberrante Expressionsmuster der miRNAs im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten stehen, ist das Interesse groß, Kontrolle über die miRNA-vermittelte Genexpression zu erhalten. Bei Krankheitsbildern, die eine Überexpression der miRNA aufweisen, kann die Inhibition der miRNA Reifung als Therapieansatz dienen. Inhibition kann z. B. durch peptidische Strukturen und durch *small molecules*, wie Aminoglykoside erfolgen.

Ziel dieser Arbeit war die nahezu vollständig festphasenbasierte Synthese von zyklischen Peptiden und Peptid-Aminoglykosid-Konjugaten als potentielle Inhibitoren der miRNA-Reifung. Ferner sollte die Guanidinylierung an fester Phase mit verschiedenen Testsubstraten gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden im ersten Teilprojekt zunächst zehn zyklische Peptide mit Hilfe eines bisfunktionalen Linkermoleküls in den Seitenketten zweier im Peptid enthaltener Cysteine synthetisiert und isoliert. Basierend auf diesem Ergebnis, wurden neun weitere zyklische Peptide an fester Phase synthetisiert, mit ausgewählten Aminoglykosiden in einer *CuAAC* gebunden und anschließend erfolgreich isoliert.

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde die Guanidinylierung an fester Phase mittels des *Goodman's Reagent* gezeigt. In ersten Studien wurden vier Testpeptide an fester Phase guanidinyliert. Da diese Methode Erfolg zeigte, wurde die Limitierung dieser Methode geprüft. Dazu wurden Aminoglykoside mittels *CuAAC* an verschiedene Peptid- und Peptid-PNA-Rückgrate geknüpft und guanidinyliert. Nicht für alle Substrate konnte die vollständige Guanidinylierung an fester Phase gezeigt werden.

Ein weiteres Teilprojekt zeigte die Funktionalisierung von kommerziell erhältlichen Polymeren für die Festphasenpeptidsynthese in Hinsicht auf fluorophorbasierte „Hochdurchsatz-Screening-Methoden“. Dazu wurde ein peptidischer Spacer entworfen, der eine Knüpfungstelle für Fluorophore mittels *CuAAC* enthielt.

Schlagworte: miRNA, Inhibition der miRNA-Reifung, zyklische Peptide, Aminoglykoside, Festphasenpeptidsynthese, *SPPS*, *CuAAC*, Guanidinylierung

Abstract

MicroRNAs (miRNA) are short long non-coding RNAs endogenous origin with a length of 21 – 23 nucleotides. MicroRNAs regulate the gene expression on post-transcriptionally level. Starting in the nucleus, primary transcripts are processed into precursor-miRNAs. Accordingly, the miRNA matures after export into cytosol. Since aberrant expression patterns are related to different diseases, it's from interest to gain control about miRNA mediated gene expression. Some diseases are related to over expression of miRNA. For that reason, the inhibition of the miRNA maturing is object of research. The inhibition can be resulted from peptidic structures or with small molecules like aminoglycosides.

Aim of this work was the solid phase synthesis of cyclic peptides derivatives and peptide aminoglycoside conjugates as potential inhibitors of the miRNA maturing. In addition, the guanidinylation on solid phase should be evidenced with different substrates.

In the first part of the project ten cyclic peptides were synthesized on solid phase. The cyclization was carried out with a bifunctional linking molecule in the side chains of two cysteines. Based on that nine cyclic peptides were synthesized and elected aminoglycosides were bound with help of *CuAAC*.

The second part of this work showed the guanidinylation on solid phase by using *Goodman's reagent* under mild conditions. Four peptides were used for initial studies. Due to the success of this method the limit was evaluated. Therefore, aminoglycosides were bound via *CuAAC* to different peptide and peptide-PNA backbones. By mischance, not all the chosen substrates were fully guanidynylated on solid phase.

A further short project showed the functionalization of commercially available resins for solid phase peptide synthesis in relation to fluorophore based high throughput screening methods. For this purpose, a peptidic spacer was devised with a binding site for fluorophores via *CuAAC*.

Keywords: miRNA, inhibition of miRNA maturing, cyclic peptides aminoglycosides, solid phase synthesis, SPPS, *CuAAC*, guanidinylation

Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren und PNA-Monomere wurden durch den Einbuchstabencode abgekürzt.

3-Azido-Boc-Guanidinoneomycin	3-Azido-(1,2',6',2'',6'''-penta(di-tert-butyloxycarbonyl-guanidino))neomycin
Äq.	Äquivalente
Å	Angström
AMO	Anti-miR Oligonukleotide
ber	berechnet
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyl-di-carbonat
brs	breites Singulett (NMR)
^t Bu	<i>tert</i> -butyl
c	Konzentration
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i>
CuAAC	Kupfer-(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition
d	Duplett (NMR)
d	Schichtdicke
d	Tag(e)
δ	chemische Verschiebung [ppm]
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>
2-DOS	2-Desoxystreptamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrosprayionisation
et al.	und andere
FA	Ameisensäure
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
Fmoc	fluorenylmethoxycarbonyl
FP-Assay	Fluoreszenzpolarisationsassay
gef	gefunden
Goodman's Reagent	<i>N,N'</i> -Di- <i>tert</i> -butyloxycarbonyl- <i>N''</i> -triflylguanidin
h	Stunde(n)
Har	<i>homo</i> -Arginin

HCTU	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyl-aminiumhexafluorophosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	<i>high resolution</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
J	Kopplungskonstante [Hz]
K _D	Bindungsdissoziationskonstante
L	Liter
λ	Wellenlänge [nm]
lncRNA	<i>long non coding RNA</i>
M	molar
m	milli
m	Multiplett (NMR)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
mg	Milligramm
min	Minute
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA	mikroRNA
mL	Milliliter
Mmt	Monomethoxytrityl
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
μ	mikro
μm	Mikrometer
n	nano
NCL	<i>native chemical ligation</i>
Nea	Neamin
Neo	Neomycin
nm	Nanometer
NMM	<i>N-Methylmorpholin</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
nt	Nukleotide
OMe-AMO	2'-O-Methyl-Anti-miR Oligonukleotide
p	pico

pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pol II	Polymerase II
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
ppm	<i>parts per million</i>
Pra	Propargylglycin
pri-miRNA	primäre-mikroRNA
PyBoB	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium- hexafluorophosphat
q	Quadruplett (NMR)
RCM	Ringschlussmetathese
R _f	<i>Retardation factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RNase III	Ribonuklease III
RRE	<i>Rev-responsive element</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
SPAAC	<i>strain-promoted Azide-Alkyne Cycloaddition</i> , spannungsvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition
SPOS	<i>solid phase organic synthesis</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> , Festphasenpeptidsynthese
t	Triplett (NMR)
TBTA	Tris[benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEC	<i>thiol-ene click reaction</i> , Thiol-En-Reaktion
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
THPTA	Tris[(1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TLC	Dünnschichtchromatographie
TOF	<i>time of flight</i>
t _R	Retentionszeit
tRNA	Transfer-RNA
UPLC	<i>ultra performace liquid chromatography</i>
UTR	<i>untranslated region</i>

uv

ultraviolet

x

1 Stand der Forschung

1.1 Biogenese der miRNA und die post-transkriptionale Genregulation durch miRNAs

MikroRNAs (miRNA) sind nicht-kodierende RNAs endogenen Ursprungs mit einer Länge von 21 – 23 Nukleotiden (nt) und sind zu etwa 40 % in Intron- oder Exon-Genbereichen lokalisiert.^[1] Im Zellkern erfolgt zunächst die Transkription der miRNAs mit der RNA-Polymerase II (Pol II).^[2] Diese prozessiert ein bis 1000 nt langes Transkript, die primäre-miRNA (pri-miRNA) mit 3'-Poly-Adenosin-Rest und 5'-Cap über 7-Methylguanosin.^[3] Es kommt zur Ausbildung von doppelsträngigen Haarnadelschleifen (*hairpins*).

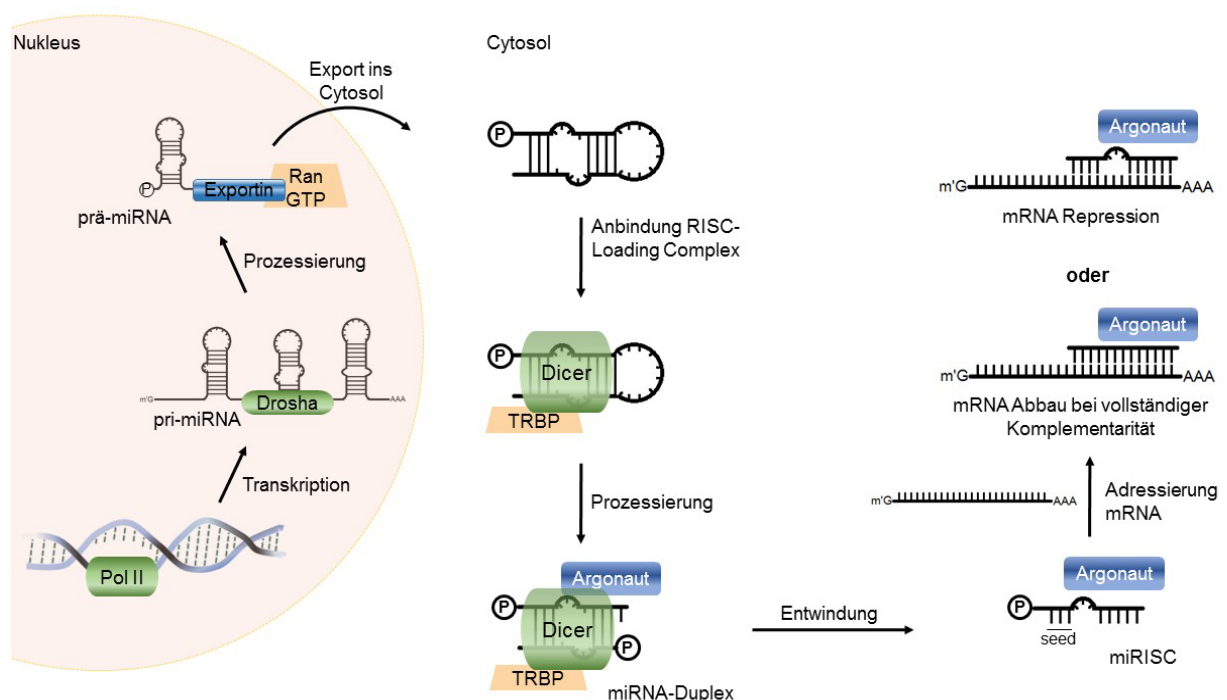


Abbildung 1.1 Schematische Übersicht zur Biogenese der miRNA. Beginnend im Nukleus wird das Primärtranskript durch Drosha zur prä-miRNA prozessiert. Nach dem Export ins Cytosol formiert sich der *RISC-Loading Complex* und die prä-miRNA wird zum miRNA-Duplex geschnitten. Nach der Entwindung erfolgt die Adressierung der mRNA.

Die Ribonuklease III (RNase III) *Drosha* und DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) binden und formen den Mikroprozessor-Komplex, aus dem die 70 – 80 nt lange, *hairpin*-förmige Präkursor-miRNA (prä-miRNA) geschnitten wird.^[4] Nachfolgend erfolgt durch *Ran*-GTP-abhängiges *Exportin 5* die Translokation vom Nukleus in das Cytosol.^[5]

Unter An- und Abbindung von Proteinen und der RNase III *Dicer* erfolgt die Erkennung der prä-miRNA vom *RISC-Loading Complex*. Durch Spaltung des terminalen *hairpins* wird die prä-miRNA zur reifen miRNA prozessiert.^[6] Es wird eine doppelsträngige miRNA mit typischen, sequenzunabhängigen Schnittmuster aus 5'-Phosphat und 2-nt-Überhang am 3'-Ende erhalten.^[7] Durch den *RISC-Loading Complex* werden beide Stränge in *guide strand* und *passenger strand* durch Vergleich der thermodynamischen Stabilität der Duplexenden definiert.^[8] Nur der *guide strand* wird vom *miRNA-induced silencing complex (miRISC)* gebunden.^[9] Dieser wird durch Rekrutierung eines Proteins der *Argonaute*-Familie (*Ago*) gebildet.^[10] Induziert durch die einsträngige miRNA bindet der gebildete Komplex am 5'-Ende der miRNA, mit sogenannter *seed*-Region an die Ziel-mRNA über eine Heptamersequenz.^[11] Bei vollständiger Komplementarität der mRNA wird diese zunächst gespalten, anschließend freigesetzt und schließlich abgebaut. Partiiell komplementäre miRNAs bewirken hingegen nur eine Repression der Translation. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt. Eine diskutierte Möglichkeit ist die Deadenylierung der mRNA und der damit verbundene schnellere Abbau.^[12]

1.2 miRNAs und Krankheiten

Die Zahl der gefundenen reifen miRNAs im menschlichen Genom ist in den letzten Jahren stark gestiegen und liegt derzeit bei etwa 1900 reifen miRNAs. Diese regulieren bis zu 60 % der Gene.^[13] Ermöglicht wird die Identifikation der miRNAs durch *Deep-Sequencing*-Experimente.^[14] Derzeitige Forschungen zeigen, dass miRNAs eine Schlüsselrolle in verschiedenen zellphysiologischen Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose spielen.^[15] Veränderte Expressionsmuster der miRNA und die Pathogenese von Krebs wurden schon länger in kausalen Zusammenhang gebracht. Bereits 2002 berichteten *Croce et al.* über herabregulierte *miR-15a* und *miR-16-1* bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL).^[16] Die CLL ist die häufigste Form von Leukämie in der westlichen Welt.^[17] Bei dieser Studie lieferten *Croce et al.* den grundlegenden Hinweis für den Zusammenhang von veränderten Expressionsmustern der miRNA mit Krebsarten. Sie fanden heraus, dass die *miR-15a* und die *miR-16-1* auf demselben Chromosomenabschnitt 13q14 liegen, der bei über der Hälfte der B-Zell-Typ-CLL-Patienten fehlt. Aufbauend auf dieser Korrelation wurde eine funktionale Studie durchgeführt, die den antiapoptotischen Faktor *BCL2* als Ziel-Protein der *miR-15a* und *miR-16-1* identifizierte. In bösartigen B-Zellen ist *BCL2* überexprimiert.^[18] Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte ein Abgleich der Lage von 186 miRNA-Genen mit denen bekannter genetischer Veränderungen.^[19] Es wurde gezeigt, dass

fast die Hälfte dieser Gene in der Nähe von fragilen oder krebsassoziierten Regionen des Genoms lokalisiert ist.

MikroRNAs können sowohl onkogen als auch tumorsuppressiv wirken.^[20] *Takamizawa et al.* beobachteten, dass die miRNA *let-7* sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* Lungenkrebs-Studien besonders herabreguliert ist.^[21] Sie stellten zudem fest, dass die herabregulierte *let-7* signifikant in Zusammenhang mit verkürztem postoperativen Überleben unabhängig vom Krankheitsstadium steht. Brustkrebs ist ebenfalls mit einem veränderten Expressionsmuster der miRNA verbunden. *lorio et al.* zeigten, dass die *miR-125b* und *miR-145* in Brustkrebszellgewebe signifikant herabreguliert sind.^[22]

Als OncomiRs werden onkogen wirkende miRNAs bezeichnet und sind in jeweiligen Tumorgewebe überexprimiert. *lorio et al.* zeigten in der gleichen Studie, dass die *miR-21* und die *miR-155* in Brustkrebszellgewebe überexprimiert ist. Darüber hinaus ist die *miR-21* auch in anderen Krebszelllinien, wie Lungen- und Darmkrebs überexprimiert und spielt somit eine mögliche Schlüsselrolle in der Karzinogenese.^[23] Diese Annahme konnten *Slack et al.* in einer *in vivo* Studie bestätigen.^[24] Dazu veränderten sie Mäuse genetisch, sodass doxycyclinabhängig eine Expression der *miR-21* erfolgte. Diese induzierte Überexpression führte zu einem *prä-B-Zell-Lymphom*. Wurde die *miR-21* herabreguliert, erfolgte eine Tumorrückbildung.

MikroRNAs stehen auch im Zusammenhang mit anderen Krankheiten.^[25] Dieses zeigten *Jeffries et al.* in ihrer Studie. Dazu verglichen sie die miRNA Expression in der frontalen Hirnrinde von Schizophreniepatienten mit gesunden Individuen.^[26] Die von ihnen untersuchten miRNAs waren bei Schizophreniepatienten überwiegend überexprimiert. Ebenso zeigten *Thum et al.*, dass die *miR-21* ebenfalls bei Herzmuskelkrankheiten überexprimiert ist.^[27]

1.3 Inhibition der miRNA

1.3.1 Inhibition durch sequenzspezifische Adressierung

Da die verschiedenen Expressionsmuster der miRNAs eng im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten stehen, ist das Interesse groß, Kontrolle über die miRNA-vermittelte Genexpression zu erhalten. Die Inhibition kann dabei auf verschiedenen Wegen erfolgen.^[28]

Ein Ansatz zur Therapie ist die Verabreichung von Oligonukleotiden, wie Anti-miRs (Anti-miRNA Oligonukleotide, AMOs) und AntagomiRs. Als Anti-miRs und AntagomiRs werden modifizierte synthetische Oligonukleotide bezeichnet, stellen nützliche Werkzeuge zur spezifischen Inhibition von individuellen miRNAs dar und können in aberrante miRNA-mRNA-Wechselwirkungen eingreifen.^[29] Ausgenutzt wird hierfür, dass für die Formierung des *miRISCs* einzelsträngige miRNA notwendig ist. Bei Applikation von komplementären

Oligonukleotiden wird durch Hybridisierung des *guide strands* ein Duplex gebildet und die Adressierung der mRNA ist nicht mehr möglich.

Aufgebaut wird dieser Therapieansatz aus den Erfahrungen auf dem Gebiet der RNA-Interferenz (RNAi). Die RNAi dabei beruht auf vollständiger Sequenzkomplementarität zur Adressierung von mRNAs durch *short interfering* RNAs (siRNA) und wurde bereits 1998 von *Mello et al.* entdeckt.^[30] In ihrer Studie wurden lange doppelsträngige RNAs (dsRNA) in Zellen geschleust. Diese dsRNAs wurden ähnlich zur miRNA-Reifung durch *Dicer* prozessiert und in den RISC-Komplex geladen. Im Gegensatz zur miRNA sind siRNAs genspezifisch, da sie perfekt komplementär zu einer bestimmten mRNA sind. Bei einer vollständigen Paarung erfolgt anschließend *Ago2*-bedingt ein Abbau der mRNA. Integrale Probleme beim Konzept der siRNAs stellt noch immer das *drug delivery* dar.^[31] Dieses beschreibt die effiziente Adressierung zum Zielorgan und die anschließende Zellpenetration. Darüber hinaus existieren *off-Target*-Effekte. Diese beschreiben die nicht immer gegebene Genspezifität durch Überkreuzregulationen der Gene.

Aus diesen Gründen erfolgte eine Entwicklung von Nukleinsäure-Analoga. Zu diesen zählen u. a. Phosphorothioate, *Locked Nucleic Acids* (LNA) und 2'-O-Methyl-AMOs (OMe-AMOs). Diese wurden von *Zamore et al.* verwendet, um die Inhibition von *let-7* in HeLa-Zellen und in *C. elegans* Larven zu zeigen.^[32] Sie fanden heraus, dass die Affinität zwischen OMe-AMOs und der miRNA im RISC-Komplex 40 mal stärker ist als zur vollständig komplementären mRNA. Ebenso zeigten *Tuschl* und seine Mitarbeiter, die Aufhebung der miRNA Funktion in HeLa-Zellen mit 24mer OMe-AMOs.^[33] *Deiters et al.* stellten *photo-caged* AntagomiRs vor, mit denen sie kontrolliert und lichtinduziert miRNAs inhibieren konnten.^[34]

Darüber hinaus werden *Peptide Nucleic Acids* (PNA) verwendet. Als PNAs werden dabei synthetische nukleinsäureähnliche Polymere bezeichnet. Das Phosphat-Ribose-Rückgrat wurde durch *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten ersetzt, an denen die DNA-Basen direkt gebunden sind. Die Interaktion von PNA wurde zuerst an DNA durch *Nielsen et al.* gezeigt. In ihrer Studie beobachteten sie eine basenspezifische Hybridisierung von PNA und DNA.^[35]

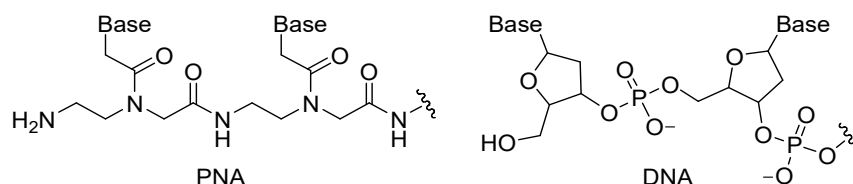


Abbildung 1.2 allgemeine Struktur der PNA (links) und der DNA (rechts) im Vergleich.

Gait und *Fabani* zeigten mit komplementärer 23mer PNA der *miR-122* in *Huh7* Zellen die Inhibition der *miR-122*.^[36] Um zelluläre Studien durchzuführen, wurde die PNA mit verschiedenen Aminosäuren (z. B. Lysin, Arginin, Cystein) konjugiert, um deren Zellgängigkeit

zu erhöhen.^[37] Einen ähnlichen Ansatz verfolgte die Gruppe um *Romanelli*, wählte aber die prä-miRNA als Target. Durch die Synthese von komplementärer PNA sollte die *Dicer* vermittelte Reifung zur *miR-210* inhibiert werden. Für Studien in den K562-Zellen (humane Leukämie) wurde die PNA mit Peptiden für Zellgängigkeit konjugiert, die aus dem Fragment 48-60 vom *HIV TAT* (*human immunodeficiency virus trans-activating regulatory protein*) stammen (siehe Kapitel 1.5).

Eine weitere Klasse stellen Aptamere dar. Diese sind kurze einsträngige Nukleinsäuren mit definierten dreidimensionalen Strukturen, die dadurch spezifische Target-Erkennung ermöglichen.^[38] So stellten *Mayer* und seine Mitarbeiter RNA-Aptamere vor, um in die Biogenese der miRNA auf Ebene der pri-miRNA einzugreifen.^[39] Sie isolierten und charakterisierten ein RNA-Aptamer, dass speziell die pri-miRNA-Polycistronen 17~18a~19a~20a~19b-1~92 adressierte. Dieses Aptamer bindet in die apikale Schleifendomäne der *pri-miR-18a* und inhibiert dadurch die Biogenese aller miRNAs in diesem Cluster.

Eine Sonderform der Anti-miRs sind *long non coding RNAs* (lncRNA). Diese sind intrazellulär gebildete, nicht kodierende Transkripte von mehr als 200 nt Länge. *Esteller* und seine Mitarbeiter zeigten in ihrer Studie, dass die lncRNA *Uc.283+A* die Prozessierung der *pri-miR-195* mittels *Drosha* durch direkte RNA-RNA-Wechselwirkung inhibiert.^[40]

1.3.2 Inhibition der miRNA-Biogenese durch *small molecules*

Niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) können im Gegensatz zu Oligonukleotiden die Hindernisse des *drug deliveries* und der *off-Target*-Effekte aufgrund ihrer *in vivo* Stabilität, einfacher Darreichung und besserer Pharmakokinetik überwinden.^[41] Um Leitstrukturen zu identifizieren, werden in der sowohl in der pharmazeutischen Industrie als auch in der akademischen Grundlagenforschung Screenings von Substanzbibliotheken durchgeführt. So untersuchten *Jin et al.* 2000 von der amerikanischen *Food and Drug Administration (FDA)* zugelassenen Verbindungen um die miRNA-Funktionen mittels RNAi zu manipulieren.^[42] Dabei stellte sich Enoxacin als potenter Inhibitor heraus. Ähnlich wie Enoxacin manipulieren andere *small molecules* die miRNA-Funktion, indem diese an Enzyme der RNAi und miRNA-Biogenese binden. Erste *small molecules* wurden durch *Rana* und seine Mitarbeiter gezeigt.^[43] Sie führten in ihrer Studie ein Screening von substituierten Dihydroteridinen durch und identifizierten zwei ungiftige, zellpermeable ATP-Analoga **ATPA18** und **ATPA21** (Abbildung 1.3).

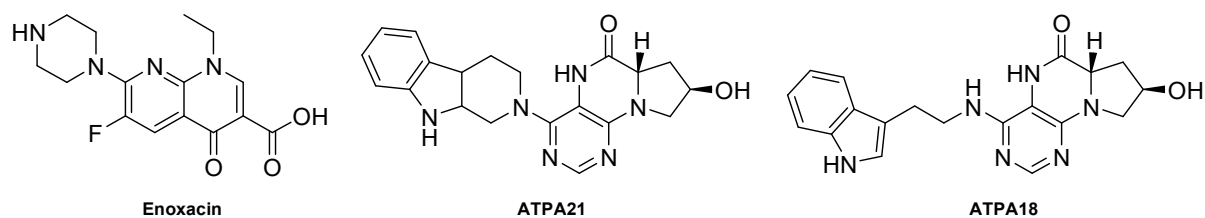


Abbildung 1.3 Strukturen von Enoxacin, ATPA21 und ATPA18.

Deiters und seine Mitarbeiter zeigten einen Ansatz zur Adressierung der *miR-21* in lebenden Zellen.^[44] Es wurde ein Assay zum Screening von über 1000 *small molecules* entwickelt. Dazu verwendeten sie ein Konstrukt aus Luciferase mRNA und dem Bindungsmotiv der 3' *untranslated region* (3'UTR) der *miR-21*. Unter Kontrollbedingungen fand eine Luciferaseexpression statt und bei Anbindung der *miR-21* war die Expression herabreguliert. Geeignete *small molecules* binden an die *miR-21* und die Luciferaseexpression wird erhöht. Dadurch wurde ein Diazobenzstrukturmotiv als Inhibitor im μM -Bereich identifiziert.

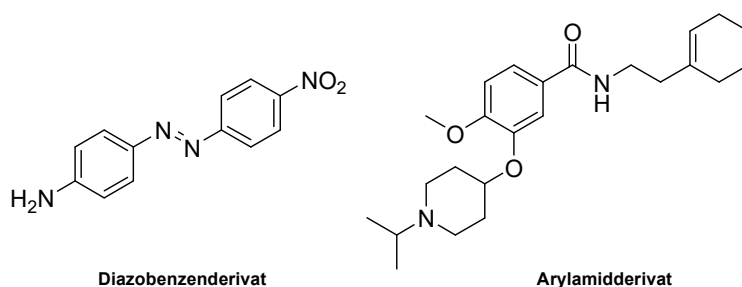


Abbildung 1.4 Darstellung der beiden erhaltenen Leitstrukturen.

In einer weiteren Studie wurden mittels dieses Assay über 300 000 Verbindungen untersucht, die Arylamide als *miR-21*-Inhibitoren identifizierten.^[45] Mittels Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden vier potenten Derivate identifiziert, die selektiv die *miR-21* inhibierten.

1.3.3 Aminoglykoside als Binder von RNA-Strukturen und prä-miRNAs

Aminoglykoside gehören zu der Klasse der Oligo-Antibiotika. Aminoglykoside können die bakterielle Proteinbiosynthese hemmen, indem sie an den internen Loop der 16S rRNA in der ribosomalen 30S-Untereinheit binden. Dort stören Aminoglykoside die mRNA Translation und die damit verbundene Biosynthese von Proteinen. Dadurch werden unvollständige Proteine oder Proteine mit ausgetauschten Aminosäuren erhalten.^[46] Die Klasse der Aminoglykoside ist groß. Die Abbildung 1.5 stellt eine Auswahl dar, die alle das 2-Desoxystreptamin (2-DOS) als Strukturmotiv aufweisen. Die gezeigten Aminoglykoside lassen sich in 4,5-O,O- und 4,6-O,O-substituiert unterteilen.^[47]

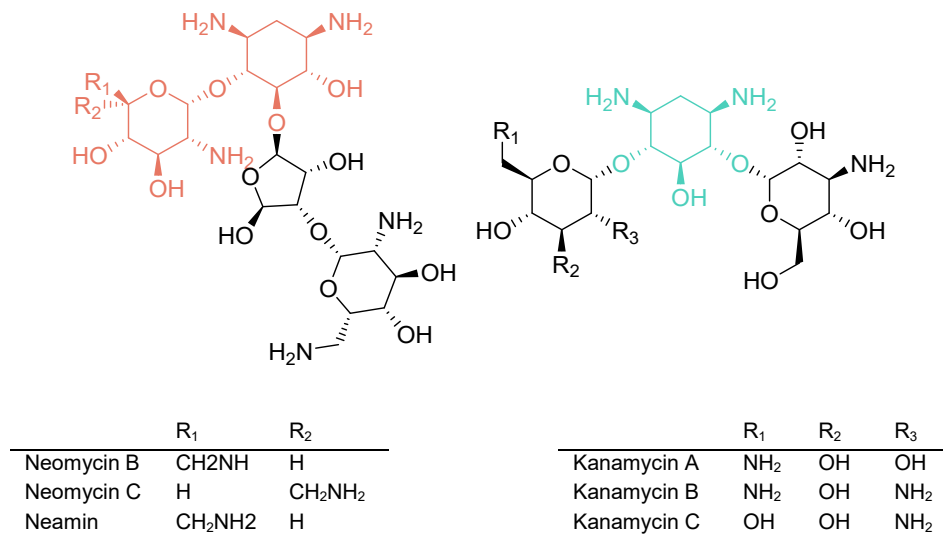


Abbildung 1.5 Übersicht einiger ausgewählter Aminoglykoside. Links sind die Aminoglykoside Neomycin B und C und Neamin (rot) abgebildet. Der Abbildungsbereich rechts zeigt die Aminoglykoside Kanamycin A, B und C. Das 2-DOS-Strukturelement ist blau markiert.

Die Wechselwirkungen zwischen Aminoglykosiden und RNA basieren im Wesentlichen auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den protonierten Aminofunktionen und dem anionischen Phosphatrückgrat. Da bei pH 7.0 die Aminofunktionen weitestgehend protoniert sind, ist die Gesamtladung für die Bindungsaffinität zur RNA verantwortlich.^[48] Wang und Tor zeigten in ihrer Arbeit die Modifikation von Aminoglykosiden mit zusätzlichen Aminofunktionen und prüften die Inhibition des *Hammerhead* Ribozyms durch Bindung dieser. Sie schlussfolgerten, dass eine Erhöhung der Aminofunktionen im Molekül die Bindungsaffinität zur RNA erhöht. Eine weiterführende Arbeit von Tor *et al.* zeigte die Synthese von dimerisierten Aminoglykosiden, um die Bindungsaffinität zur RNA zu erhöhen.^[49] Ihre Arbeit basierte auf der Theorie, dass dimerisierte Aminoglykoside zwei Bindungsseiten für RNA besitzen. Dazu wurden verschiedene Dimere aus Neomycin B, Kanamycin A und Tobramycin auf Bindung zum Targetenzym *Tetrahymena* Ribozym L-21 *Sca I* geprüft. Es zeigte sich, dass Dimere stärker an RNA aufgrund ihrer gleichmäßigen Ladungsverteilung und des Strukturdesigns binden.

Aminoglykoside binden vorwiegend an Ausbuchtungen (*bulge*) von RNA-Sekundärstrukturen, weisen aber keine typische Bindung an *hairpins* auf.^[50] Da *hairpins* das hauptsächliche Strukturmotiv bei RNA-Sekundärstrukturen darstellen, entwickelten Hergenrother und seine Mitarbeiter ein Konzept aus 2-DOS-Dimeren, welche gezielt an *hairpins* binden sollten.^[51] Diese 2-DOS-Dimere besitzen Bindungsdissoziationskonstanten (K_D -Wert) im niederen μM -Bereich. Auf dieser Basis synthetisierten Hergenrother *et al.* mit Hilfe der Kupfer(I)-katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition (siehe Kapitel 1.4.2) passgenaue Liganden.^[52] Diese Liganden wiesen für die *small molecule*-RNA-Wechselwirkung zu den von ihnen gewählten

RNA-*hairpins* ebenfalls K_D -Werte im unteren μM -Bereich auf. Diese Konzepte wurden jedoch nicht auf natürliche RNAs, wie prä-miRNAs angewendet.

Small molecule-Konzepte benötigen geeignete Assaymethoden. So wurde in der Arbeitsgruppe Arenz ein homogener Assay entwickelt, der auf Ebene der *Dicer* vermittelten miRNA-Reifung arbeitet.^[53] Basierend auf dem Funktionsprinzip der *molecular beacons* erfolgt eine Markierung sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende der gewählten prä-miRNA mit Fluoreszenzlöscher (Quencher) und Fluorophor. Bleibt der *hairpin* aufgrund einer Inhibition der Prozessierung durch *Dicer* intakt, erfolgt eine Fluoreszenzlöschung durch Kontakt-Quenching. Eine Prozessierung bewirkt hingegen einen Fluoreszenzanstieg.

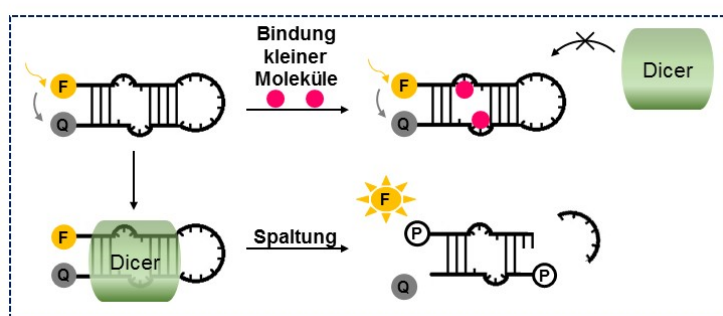


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des fluoreszenzbasierten Assays der miRNA-Reifung.

Mit dem Assay wurde anhand von markierter prä-*let-7* gezeigt, dass Kanamycin A bei einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ die Prozessierung durch *Dicer* inhibiert.

In *small molecule* Studien in der Arbeitsgruppe Arenz wurden basierend auf dem Konzept von *Hergenrother et al.* dimere Neamin- und 2-DOS-Derivate synthetisiert und auf Inhibition der *let-7*-Reifung getestet.^[54] Die mittels des fluoreszenzbasierten Assays getesteten Verbindungen zeigten sogar eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) im niederen μM -Bereich.

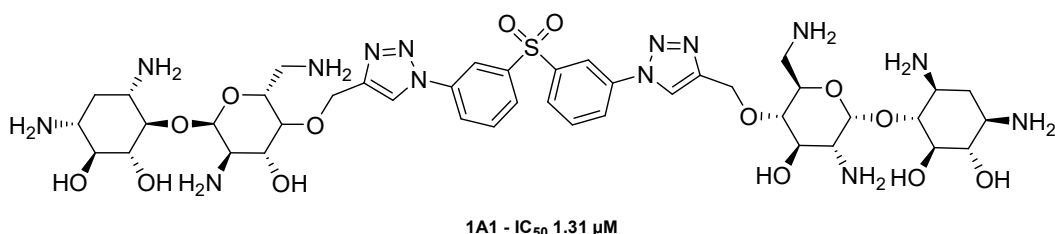


Abbildung 1.7 Darstellung eines ausgewählten Neamin-Dimers. Das gezeigte Dimer ist über zwei 1,2,3-Triazole mit einem Spacermolekül verbunden. Der erhaltene IC_{50} -Wert liegt bei $1.31\mu\text{M}$.

Da doppelt markierte prä-miRNAs ein Verschieben der Schnittstelle durch *Dicer* bewirken können, wurde ein weiterer Assay zur Detektierung der Inhibition der miRNA-Reifung mittels

unmarkierter prä-miRNA entwickelt.^[55] Dazu werden die zu testenden Verbindungen, die gewählte prä-miRNA und *Dicer* inkubiert und die Menge an gebildeter reifer miRNA durch isothermale *Rolling Circle Amplification (RCA)* in Gegenwart eines nukleinsäurespezifischen Fluorophors bestimmt. Als Primer dient allein die vom 5'-Ende stammende reife miRNA. Diese bindet an ein zirkuläres DNA-Templat und leitet durch die DNA-Polymerase *Bst* die Amplifizierung ein. Ein zusätzlicher Primer dient der *Branched Rolling Circle Amplification (BRCA)*.

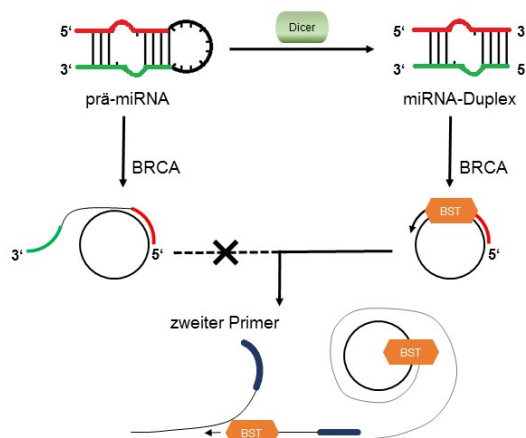


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des BRCA-basierten Assay der miRNA-Reifung.

Kürzlich zeigten *Duca* und ihre Mitarbeiter basierend auf dem in der Arbeitsgruppe *Arenz* entwickelten Konzept zur Synthese von dimeren 2-DOS-Derivaten bimodale Liganden.^[56]

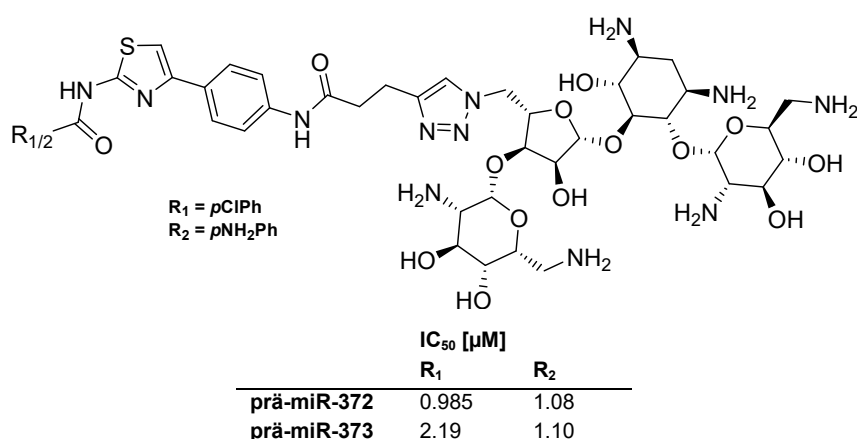


Abbildung 1.9 Darstellung der erhaltenen Strukturen und der erhaltenen IC₅₀-Werte für die *prä-miR-372* und -373.

Basierend auf dem Strukturmotiv zusammengesetzt aus einer künstlichen Nukleobase und einem Aminoglykosid, derivatisierten sie die Nukleobase, den Linker und den Aminoglykosidteil. Diese künstliche Nukleobase wechselwirkt spezifisch mit Purin-Pyrimidin-Basenpaaren dsRNAs und dsDNAs.^[57] In dieser Studie wurden die synthetisierten bimodalen

Liganden auf Inhibition der Prozessierung der *prä-miR-372* und *-373* getestet. Es wurden zwei Verbindungen mit IC_{50} -Werten im niederen μM -Bereich erhalten. Als geeigneter Assay wurde der von der Arbeitsgruppe *Arenz* gezeigte Assay mittels doppeltmarkierter *prä-miRNA* gewählt.

Die *prä-miR-21* ist auch als Target für die Inhibition durch Aminoglykoside interessant. So stellten *Maiti* und seine Mitarbeiter Streptomycin als spezifischen Inhibitor Reifung der *miR-21* dar.^[58] Dazu wurden in dieser Studie 15 verschiedene Aminoglykoside getestet. Die Spezifität von Streptomycin zur *miR-21* ist jedoch nicht so hoch, da in dieser Studie beim Expressionsvergleich von zehn verschiedenen miRNAs, die Konzentration der *miR-27a* ebenfalls stark sank.

1.4 Peptide – Synthese und chemische Modifikation

Peptide sind mittels Amidbindung (Peptidbindung) kovalent gebundene Aminosäuren. Die Bindung erfolgt dabei zwischen der Carboxyfunktion einer Aminosäure und der Aminofunktion einer anderen Aminosäure. Die kleinste Form von Peptiden bilden die Dipeptide, gefolgt von Tri- und Tetrapeptiden. Längere unverzweigte Peptidketten werden als Oligo- und Polypeptide bezeichnet. Darüber hinaus kann in Makropeptide, zyklische Peptide und Proteine unterteilt werden. Proteine unterliegen Sekundär- und Tertiärstrukturmotiven und werden aus einem oder mehreren Polypeptiden gebildet. Zellbiologisch werden Peptide z. B. als nichtribosomale Peptide erhalten.

Die klassische Näherung der chemischen Peptidsynthese erfolgt mittels Flüssigphasensynthese, besitzt aber im Vergleich zur Festphasenpeptidsynthese viele präparative Nachteile.

1.4.1 Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis, SPPS*) wurde bereits 1963 von *Merrifield* beschrieben.^[59] Dabei zeigte er den zielgerichteten Aufbau von Peptiden an einer festen Phase. Die Immobilisierung der Aminosäure erfolgt über den C-terminalen Carboxyterminus an einer Ankergruppe (Linker), die an ein unlösliches Polymer (Harz) gebunden ist. Für diesen bahnbrechenden Fortschritt in der Peptidsynthese erhielt *Merrifield* 1984 den Nobelpreis für Chemie.

Es wurde gezeigt, dass nicht nur Peptide, sondern auch Oligonukleotide an fester Phase aufgebaut werden können.^[60] Darüber hinaus bildet die *SPPS* Grundlage für die Entwicklung von Peptidbibliotheken und kombinatorischer Chemie.^[61]

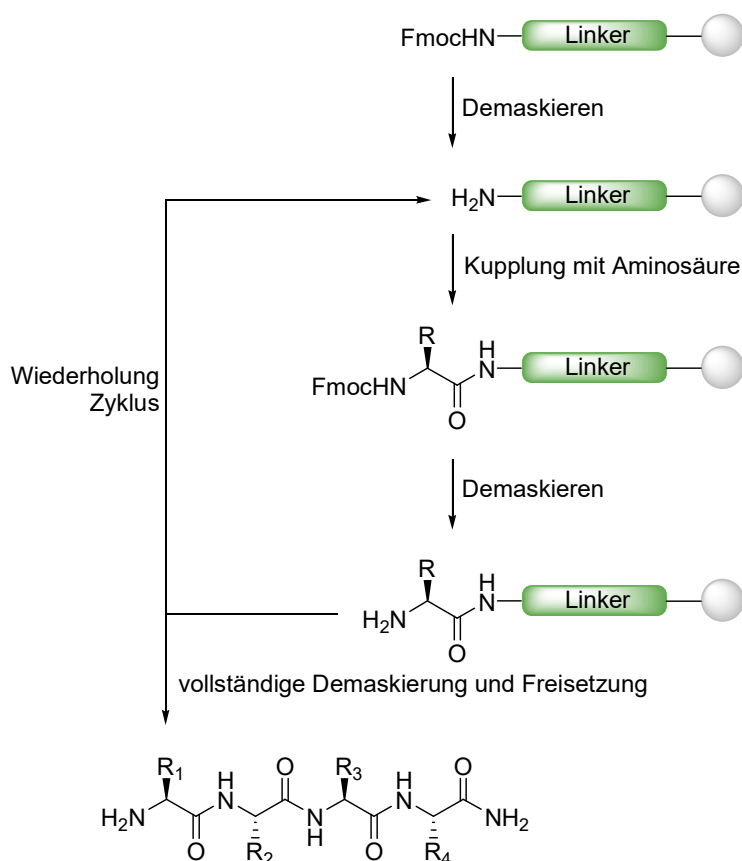


Abbildung 1.10 Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese. Das mit einem Linker funktionalisierte Harz wird bei der Fmoc-Strategie mittels Piperidin in *N,N*-Dimethylformamid demaskiert. Nachfolgend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure mit Hilfe von Base und Kupplungsreagenz. Diese Aminosäure wird anschließend demaskiert und der Zyklus kann erneut beginnen. Schließlich wird das erhaltene Peptid vollständig demaskiert und vom Harz freigesetzt. Je nach Linker wird das Peptid am C-Term als Carbonsäureamid oder als Carbonsäure erhalten.

Zunächst erfolgte die *SPPS* mit *N*-terminal *tert*-butoxycarbonyl (Boc) maskierten Aminosäuren. Die Boc-Schutzgruppe wurde bereits 1957 von *Carpino* beschrieben.^[62] Die Seitenketten der Aminosäuren sind bei dieser Schutzgruppenstrategie mit Benzylgruppen (Bn) versehen. Die Freisetzung vom Harz und Demaskierung der Seitenketten erfolgte mit flüssigem Fluorwasserstoff.^[63] Mit der Einführung der Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) für den *N*-Term und Schutzgruppen vom *tert*-Butyl-Typ (*t*Bu) in den Seitenketten der Aminosäuren wurde eine neue Schutzgruppenstrategie für die *SPPS* etabliert.^[64] Im Wesentlichen unterteilt man heute in diese zwei Schutzgruppenstrategien. Die *SPPS* ist durch wiederholende Zyklen von Demaskieren-Waschen-Kuppeln-Waschen gekennzeichnet (Abbildung 1.8). Im ersten Schritt gemäß der Fmoc-Strategie erfolgt die C-terminale Anbindung der freien Carbonsäurefunktion der Fmoc-maskierten Aminosäure an ein mit Linker (z. B. Rinkamid-Linker) versehenes Polymer (Harz). Es existiert eine Vielzahl von Linkern über die Aminosäuren an das Polymer gebunden werden können.^[65] Anschließend wird die *N*-terminale Aminofunktion mit Piperidinlösung demaskiert. Die Aktivierung der zu kuppelnden Aminosäure erfolgt mit Kupplungsreagenzien, wie 2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-

yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat (HCTU). Auch hier existiert eine Vielzahl von Kupplungsreagenzien.^[66] Mit diesen Kupplungsreagenzien wird die Carbonsäurefunktion der Aminosäure in einen Aktivester überführt und es erfolgt die Kupplung an das Harz. Nachfolgend wird die *N*-terminale Aminosäurefunktion erneut demaskiert und der Kupplungszyklus beginnt von vorn. Das erhaltene Peptid kann im Folgenden mittels Trifluoressigsäure in den Seitenketten demaskiert und vom Harz freigesetzt werden. Alle Reaktionsschritte sind von Waschschritten begleitet.

Mittels Festphasenpeptidsynthese können so Peptide schnell und zielgerichtet aufgebaut werden. Die Reinigung nach Kupplung einer Aminosäure erfolgt durch simples Waschen und nach Freisetzung vom Harz ist nur ein Aufreinigungsschritt, durch einfaches Fällern oder Säulenchromatographie notwendig.

1.4.2 Methoden der Biokonjugation zur Modifikation von Peptiden

Peptide können darüber hinaus modifiziert und konjugiert werden. Die Biokonjugation ist hierfür eine Methode und beschreibt die kovalente Bindung von mindestens einem Biomolekül z. B. mit kleinen Molekülen (z. B. mit Biotin oder Fluorophoren), von Proteinen mit Proteinen oder Antikörpern mit Enzymen. Konjugationen erfolgen meist an Lysin, Cystein, C- oder *N*-Term.^[67] Aufgrund der häufig mangelnden Chemo-selektivität treten bioorthogonale Reaktionen mittels nicht-nativer Funktionalitäten in den Fokus. Heutzutage stellen sie ein wichtiges Werkzeug in der chemischen Biologie dar und inspirierten sogar zu Substanzbibliotheken.^[68]

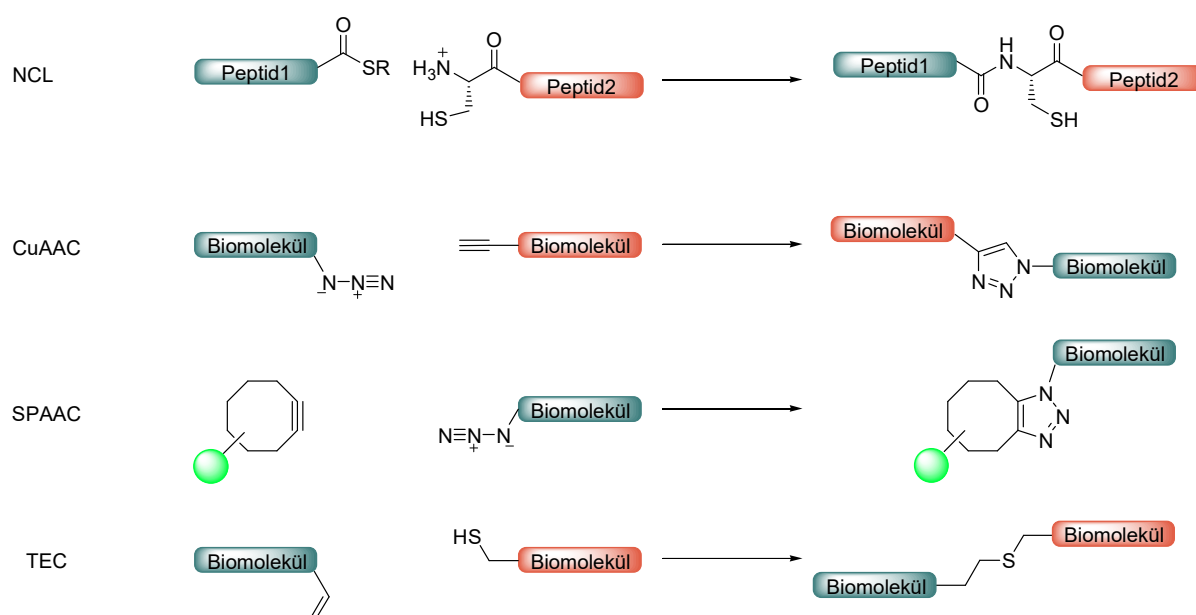


Abbildung 1.11 Schematische Darstellung der ausgewählten Biokonjugationsreaktionen. *NCL* – native chemical ligation; *CuAAC* – Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition; *SPAAC* – spannungsvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition und *TEC* – Thiol-En-Reaktion.

Zu den Biokonjugationsreaktionen zählen u. a. die *native chemical ligation* (NCL), die Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC), die spannungsvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition (*strain-promoted Azide-Alkyne Cycloaddition*, SPAAC) und die Thiol-En-Reaktion (*thiol-ene click reaction*, TEC) (Abbildung 1.11). Die Biokonjugationsreaktionen können auch zur Modifikation von Peptiden, chemisch-synthetischen Ursprungs, verwendet werden.

CuAAC, SPAAC und TEC zählen darüber hinaus zur *Click-Chemie*. Bereits 2001 wurde dieses Konzept von Kolb, Finn und Sharpless postuliert.^[69] Die *Click-Chemie* beschreibt dabei den zielgerichteten Aufbau von Molekülen aus kleineren Einheiten. Die Synthese ist einfach, chemoselektiv, verläuft in hohen Ausbeuten und lässt milde Reaktionsbedingungen zu.

Die CuAAC wurde 2002 unabhängig von Sharpless *et al.* und Meldal *et al.* gezeigt.^[70] Bei der CuAAC werden kupfer(I)-vermittelt 1,2,3-Triazole aus Aziden und terminalen Alkinen gebildet. Kupfer(I) kann durch Kupferiodid bereitgestellt werden, jedoch ist die Stabilität von Kupfer(I) gering (Abbildung 1.12). Alternativ werden Kupfer(II)-salze eingesetzt, die *in-situ* mit Natriumascorbat zu Kupfer(I) reduziert werden. Die Stabilisierung der Kupfer(I)-Spezies erfolgt durch Einsatz eines stabilisierenden Liganden.

Die Gruppe um Fokin hat 2004 gezeigt, dass Tris[benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) die Ausbeute der CuAAC erhöht, die Reaktionszeit verkürzt und die katalytische Aktivität des Kupfer(I) steigert.^[71] Mit diesem Liganden kann auch ein breites Spektrum an Lösungsmitteln verwendet werden.

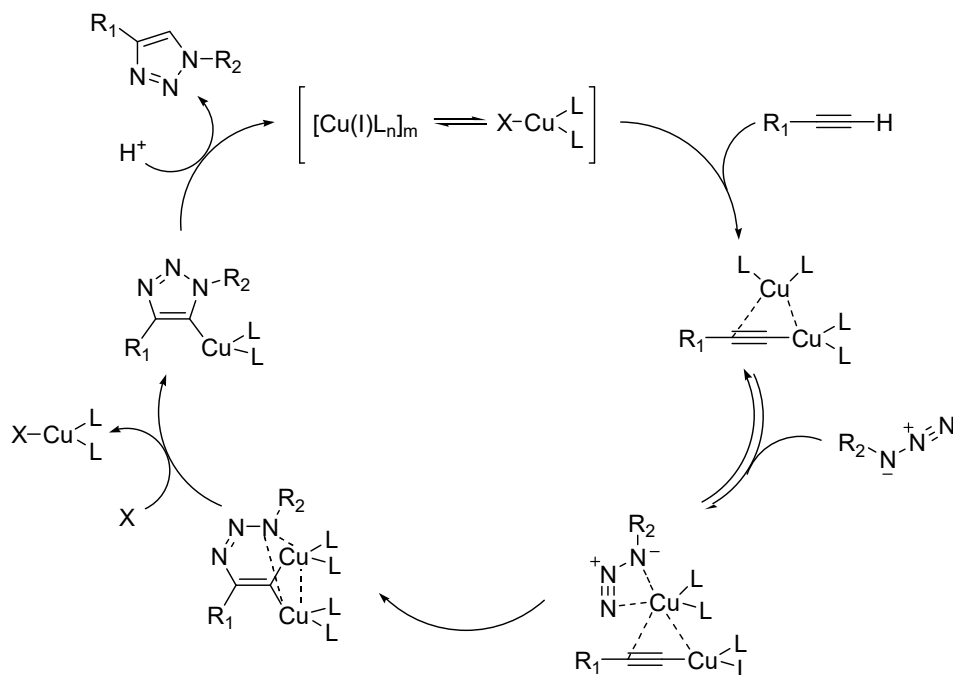


Abbildung 1.12 Reaktionsschema der CuAAC. Der Reaktionsmechanismus erfolgt über ein dinukleares Kupferintermediat.^[72]

Mit Hilfe der *CuAAC* können auch Peptide modifiziert werden, indem die Amidbindung durch 1,2,3-Triazole ersetzt wird. So wurde von *Angelo* und *Arora* die Synthese von Triazololigomeren gezeigt.^[73]

Festphasenbasiert wurde von *Chaiken et al.* die *CuAAC* mit Azidoprolin und verschiedenen Alkinen gezeigt.^[74] Sie synthetisierten so verschiedene Peptide, die als Antagonisten für das *HIV-1*-Hüllglykoprotein *gp120* fungieren sollten.

Die *SPAAC* verbessert die Biokompatibilität der Azid-Alkin-Cycloaddition. Die Reaktion erfolgt ohne Metallkatalyse und basiert allein auf der Ringspannung des Cyclooctins. Das Cyclooctin ist der kleinste stabile Vertreter der Cycloalkine. Die „explosionsartige“ Reaktion mit Phenylazid wurde zuerst von *Wittig* und *Krebs* gezeigt.^[75] Mit der *SPAAC* wurde eine Ligationsmethode von Cyclooctinen und Aziden ohne zytotoxische Effekte gezeigt.^[76] Hauptsächlich wird diese Art der *Click-Chemie* für das Markieren von Biomolekülen und Fluorophoren verwendet.^[77] *Seitz* und *Abendroth* haben darüber hinaus gezeigt, dass eine Konjugation mittels *SPAAC* von Peptiden mit Oligonukleotiden möglich ist.^[78]

Die *Thiol-En-Reaktion* ist eine Additionsreaktion von Thiolen an Doppelbindungen und wurde bereits 1905 beschrieben.^[79] Bei der *TEC* wird in photochemisch initiierte und *Michael*-artige Reaktion unterschieden.^[80] Die *TEC* findet Anwendung z. B. bei verschiedenen Glykokonjugationen. Das Review von *Dondoni* und *Marra* gibt hierfür eine gute Übersicht.^[81] *Kazmaier* und *Karmann* zeigten die Modifizierung von maskierten Allylglycinen und Peptiden mit ungesättigten Alkylseitenketten mittels der *Thiol-En-Reaktion*.^[82] Darüber hinaus wurde von *Scanlan et al.* eine Kombination von *NCL* und *TEC* zur Darstellung von Glykopeptiden gezeigt.^[83] Dazu wurden zunächst zwei Peptide über die *NCL* ligiert und anschließend glykosidische Reste über die *Thiol-En-Reaktion* an das Peptid geknüpft.

1.4.3 Glykosylierungen an Peptiden

Glykosylierungen mit Kohlenhydraten erfolgen meist in den Seitenketten von Asparagin (*N*-Glykosylierung) oder Serin und Threonin (*O*-Glykosylierung) und führen zu Glykopeptiden. Seltener wird an Tryptophanresten (*C*-Glykosylierung) glykosyliert.^[84] Die Synthese von Glykopeptiden kann chemisch, enzymatisch oder mittels molekularbiologischer Methoden erfolgen oder auch in Kombination. Im Allgemeinen wird die *SPPS* zum Aufbau des Peptidgerüsts verwendet. Soll die Glykosylierung an fester Phase erfolgen, ist eine geeignete Schutzgruppenstrategie an Peptid und Kohlenhydrateinheit erforderlich. Das so gebildete Glykopeptid muss unter milden Bedingungen demaskiert werden, da die glykosylierten Seitenketten der Aminosäuren sowohl basen- als auch säurelabil sein können.^[85] Dazu zeigte die Gruppe um *Guo* einen festphasenbasierten Aufbau eines *CD-52* Glykopeptids mit einer säurelabilen Fucosylgruppe.^[86]

N-Glykosylierung erfolgt meist mit (geschützten) Glucosaminen in der Seitenkette des Asparagins (Abbildung 1.11a).^[87] Die *N*-Glykosylierung kann ebenfalls in einer *Staudinger-Reaktion* mit azidmaskierten Kohlenhydraten erfolgen.^[84b] Die *O*-Glykosylierung erfolgt standardmäßig mit Glykosyldonoren, wie z. B. Trichloroacetimidat.^[88]

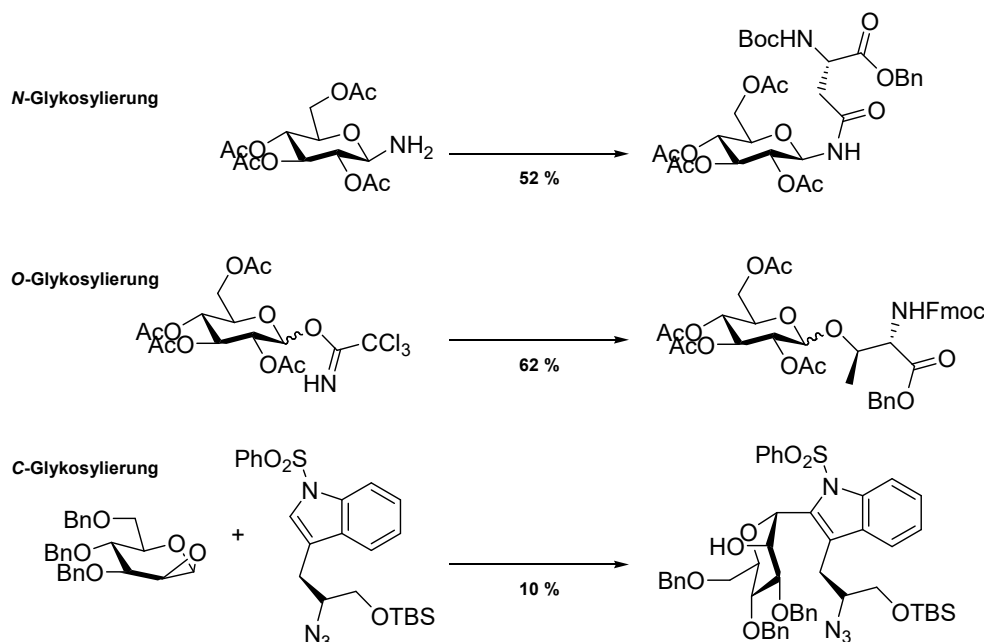


Abbildung 1.13 Übersicht der beschriebenen Glykosylierungen (eine Auswahl). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Boc-Asp-OBn, Dicyclohexylcarbodiimid, HOBT, CH₂Cl₂, *N,N*-Dimethylformamid, RT, 2 h; b) Fmoc-Thr-OBn, HClO₄-Kieselgelsäule; c) Butyllithium, BF₃·OEt, Tetrahydrofuran.

Es wurde auch gezeigt, dass die *O*-Glykosylierung mit *n*-Pentenyl-Glykosiden möglich ist.^[89] Ito und seine Mitarbeiter zeigten die C-Glykosylierung an Tryptophan über eine Ringöffnung eines Mannosederivates und einem Lithiumderivates der Tryptophanseitenkette (Abbildung 1.13c).^[90]

Die Glykosylierung kann auch metallkatalysiert durch z. B. CuAAC erfolgen. So zeigte die Gruppe um Rutjes eine Glykosylierung mit Azidoglykosiden und alkinderivatisierten Aminosäuren.^[91] Diese Reaktion bedarf keiner besonderen Schutzgruppenstrategie und führt zu einer möglichen Verbesserung der Stabilität des Glykopeptids.

1.4.4 Zyklisierungsreaktionen an Peptiden

Zyklische Peptide sind Peptidketten, die eine Ringstruktur bilden. Mit der Entdeckung von Gramacidin in dem Bakterium *Bacillus brevis* 1944 wurde ein Meilenstein für zyklische Peptide gesetzt.^[92]

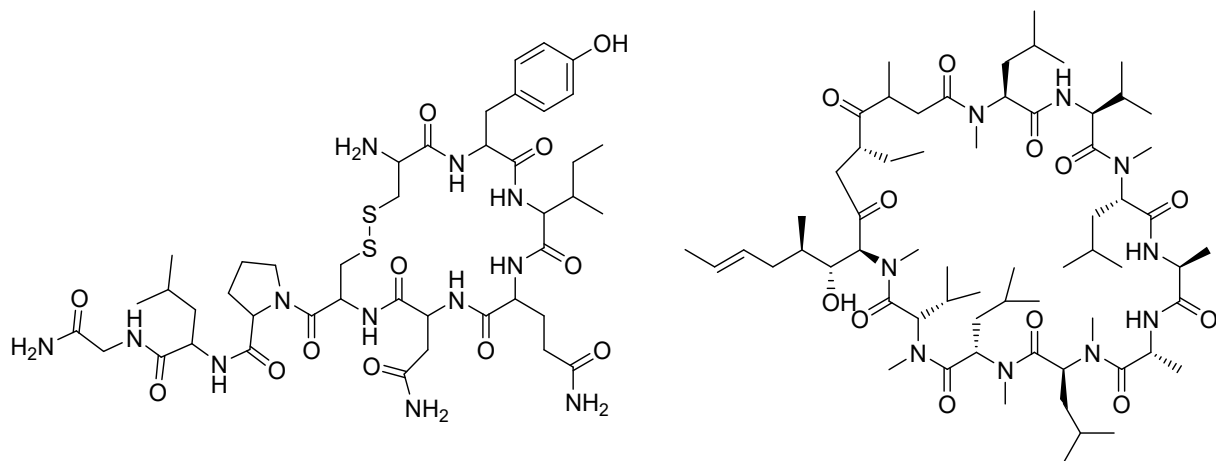


Abbildung 1.14 Darstellung der bioaktiven zyklischen Peptide Oxytocin (links) und Cyclosporin (rechts).

Bioaktive zyklische Peptide, wie z. B. Oxytocin, Vasopressin und Cyclosporin aus natürlichen Extrakten sind seit vielen Jahren in der Medizin von Interesse, da sie im Gegensatz zu *small molecules* zu verhältnismäßig harmlosen Metaboliten führen.^[93] Aufgrund ihrer Größe und der zahlreichen Synthesemöglichkeiten sind die Produktionskosten von zyklischen Peptiden im Vergleich zu Proteinen geringer.^[94]

Zyklische Peptide sind im Vergleich zu ihren linearen Vorläufern in ihrer Konformation eingeschränkt, bilden durch Zyklisierung Sekundärstrukturen aus, sind widerstandsfähiger gegen Exo- und Endoproteasen und weisen höhere Bioaktivität auf.^[95] Darüber hinaus haben zyklische Peptide meist eine höhere Zellpermeabilität.^[96] *Rezai et al.* synthetisierten dazu in ihrer Studie zahlreiche Peptide und verglichen die Zellpermeabilität der zyklischen Peptide mit ihren linearen Vorläufern.

Im Allgemeinen können Peptide in Abhängigkeit zu ihren funktionellen Gruppen auf vier verschiedenen Wegen zyklisiert werden: *head-to-tail* (*N*-Terminus zum *C*-Terminus), *side-chain-to-tail*, *head-to-side-chain* oder *side-chain-to-side-chain*.^[97] Die meisten Zyklisierungsreaktionen führen so zu Lactam- oder Lactonbildung oder zu Disulfidbrückenbildung.^[98]

Die festphasenbasierte Zyklisierung von Peptiden erfolgt für gewöhnlich durch Anbindung des linearen Vorläufers über die Seitenkettenfunktionen einer trifunktionalen Aminosäure, wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Für die Zyklisierung an fester Phase wird so eine dreidimensionale Schutzgruppenstrategie zum Aufbau des linearen Vorläufers, zur Demaskierung des *N*- und *C*-Term (*head-to-tail*) und zur Freisetzung vom Harz benötigt. Auf diese Weise zeigten *Papini et al.* festphasenbasiert die Synthese eines zyklischen Tetrapeptids ohne Nebenprodukte.^[99]

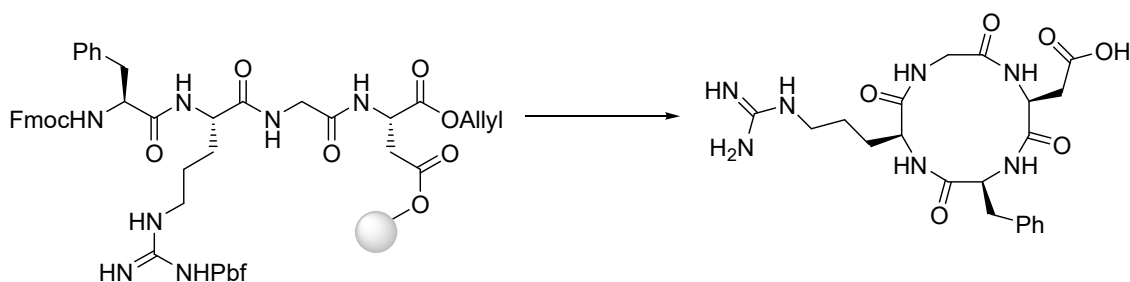


Abbildung 1.15 Schematische Darstellung der Synthese eines zyklischen Tetrapeptids nach *Papini et al.*

Eine *side-chain-to-side-side-chain* Zyklisierung beinhaltet im klassischen Sinne die Kondensation zwischen Asparaginsäure oder Glutaminsäure und Lysin.^[100]

Die Zyklisierung kann auch durch C-C-Bindungsknüpfung erfolgen. Bereits 1996 zeigten *Grubbs* und seine Mitarbeiter die Zyklisierung eines Tetrapeptids mittels Ringschlussmetathese (*RCM*).^[101] Dazu verwendeten sie ein vorher beschriebenes, durch Disulfidbrücken zyklisiertes Tetrapeptid.^[102] Sie ersetzten die Cysteinreste durch Allylreste und erhielten nach *RCM* das zyklische Peptid.

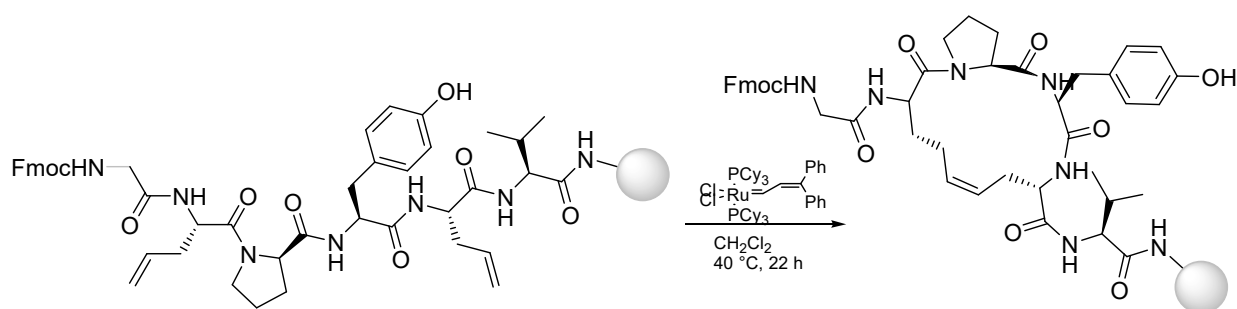


Abbildung 1.16 Ringschlussmetathese am Tetrapeptid zum zyklischen Peptid durch *Grubbs et al.*

Die Gruppe um *Verdine* zeigte die Synthese von „stapled peptides“.^[103] Dabei synthetisierten sie zyklische Peptide mittels *RCM* und konservierten darüber hinaus die α -helikale Struktur des Peptids. Diese „stapled peptides“ finden Einsatz in der Manipulation von Protein-Protein-Interaktionen. Die Arbeitsgruppe um *Pentelute* zeigte mit der Zyklisierung durch Dithioetherbildung, dass das „stapled peptide“ im Vergleich zum linearen Vorläufer eine höhere die Bindungsaffinität zum Targetprotein aufwies.^[104] Das zyklisierte Peptid zeigte ebenfalls eine bessere Stabilität gegen proteolytischen Abbau. Durch nukleophile aromatische Substitution an Hexafluorbenzen erfolgte die Zyklisierung durch Dithioetherbildung in den Seitenketten zweier Cysteine. Der Abstand der Cysteine ($i, i+4$) wurde so gewählt, dass die α -helikale Struktur des Peptids stabilisiert wurde.

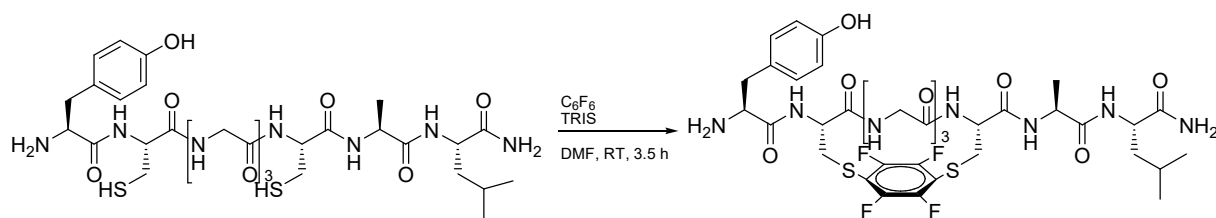


Abbildung 1.17 Zyklisierung durch Dithioetherbildung in den Seitenketten zweier Cysteine.

Zyklisierungen von Peptiden können auch über die *CuAAC* erfolgen. So zeigte die Gruppe um *Maarseveen* 2006 eine *head-to-tail*-Zyklisierung eines Tetrapeptids von *N*-terminalen Aziden und C-terminalen Alkinen in Lösung.^[105] Sie konnten in ihrer Studie belegen, dass das mittels *CuAAC* zyklisierte Peptid die gleiche biologische Aktivität wie das natürliche Tetrapeptid aufwies. Zyklisierungen mit Hilfe der *CuAAC* sind ebenfalls an fester Phase möglich. Die Gruppe um *Lokey* zeigte mit Hilfe von C-terminal immobilisiertem Propargylglycin und einem *N*-terminalen L-Azido-Leucin eine *tail-to-side-chain*-Zyklisierung an kleinen Peptiden.^[106] Zyklisierungen an kleinen Peptiden bereiten aufgrund der Rinspannung Schwierigkeiten, wenn die Aminosäuren Glycin oder Prolin nicht enthalten sind. Diese begünstigen die Bildung von β -turns und erleichtern die Ringbildung bei kleineren Peptiden. Die Verwendung der *CuAAC* bei kleineren Peptiden zur Zyklisierung führt zu einem ähnlichen Effekt und begünstigt somit die Ringbildung.

Durch die Gruppe um *Meldal* wurde 2004 eine *side-chain-to-side-chain*-Zyklisierung an fester Phase mittels *CuAAC* gezeigt. Dazu verwendeten sie ebenfalls L-Propargylglycin und L-Azidoalanin.^[107]

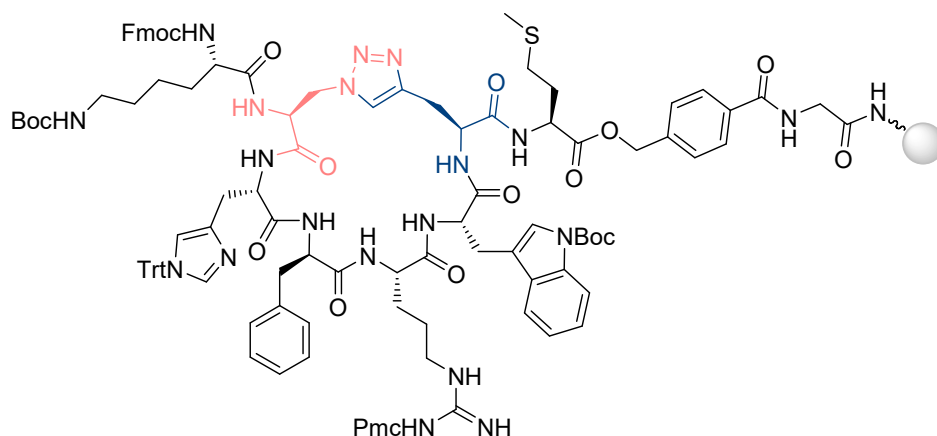


Abbildung 1.18 Struktur des zyklischen Peptids nach *Meldal et al.*. Die Zyklisierung über die *CuAAC* macht der farbmarkierte Bereich deutlich. Die Seitenketten vom L-Propargylglycin (blau) und L-Azido-Leucin (rot) bilden das 1,2,3-Triazol.

Die *Thiol-En-Reaktion* kann ebenfalls zur Darstellung von zyklischen Peptiden verwendet werden. Von *Anseth et al.* wurden an fester Phase verschiedene Makrozyklen über Thiole und Allyle (und Norbene) dargestellt.^[108]

1.4.5 Peptide und Peptoide als Binder von prä-miRNA

Die Inhibition der Prozessierung der prä-miRNA kann auch durch Peptide und Peptoide erfolgen. Peptoide sind dabei *N*-substituierte Oligoglycine, die mittels Festphasenpeptidsynthese leicht zugänglich sind.^[109] Peptoide sind proteolysestabil, zellpermeabel und können zu Bibliotheken aufgebaut werden.^[110]

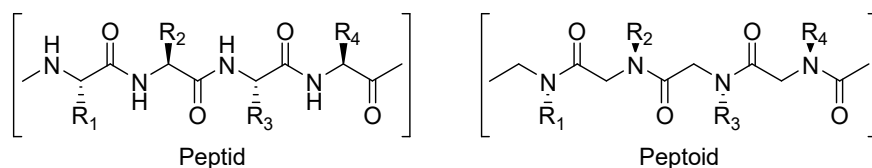


Abbildung 1.19 Schematische Darstellung eines Peptids (links) und eines Peptoids (rechts).

Luebke und seine Mitarbeiter haben über Microarrays 7680 verschiedene Peptoide auf Glasplatten immobilisiert und versuchten Liganden für den *hairpin* der *prä-miR-21* zu identifizieren.^[111] Es wurde ein Peptoid **13** gefunden, das einen K_D-Wert von 1.9 µM aufwies. Dieser K_D-Wert unterschied sich sogar im Faktor 20 von der Kontroll-RNA.

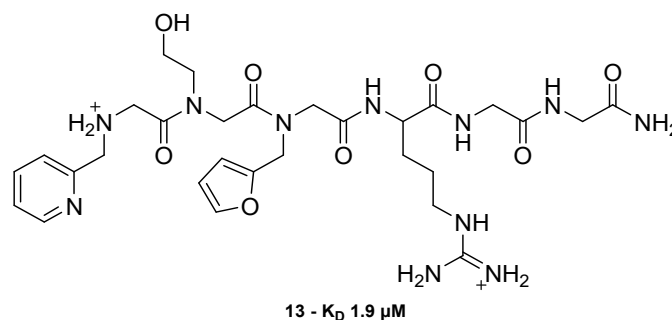


Abbildung 1.20 Struktur des Peptoids 13. Für Peptoid 13 wurde ein K_D-Wert von 1.9 ± 0.5 µM erhalten.

Die Adressierung der RNA kann ebenfalls durch Peptide und Proteine erfolgen: So bindet das endogene Protein *lin28* die *prä-let-7* und verhindert dadurch die Prozessierung durch *Dicer*.^[112] Dieses wurde von *Wulczyn et al.* in embryonischen Stammzellen gezeigt.

Die Gruppe um *Robinson* synthetisierte auf Basis der RNA-Adressierung zyklische Peptide, welche die Bindung des *HIV-1-Rev*-Proteins an die *Rev-responsive-element*-Bindungsstelle (*RRE*) inhibieren sollten.^[113] *Robinson et al.* erzielten damit einen K_D-Wert von 2 nM. Inhibition

kann auch durch Interkalation der RNA erfolgen. So zeigten *Beal* und *Gooch* mit Peptid-Acridin-Konjugaten eine Interkalation an helikale RNA-Duplexstrukturen.^[114]

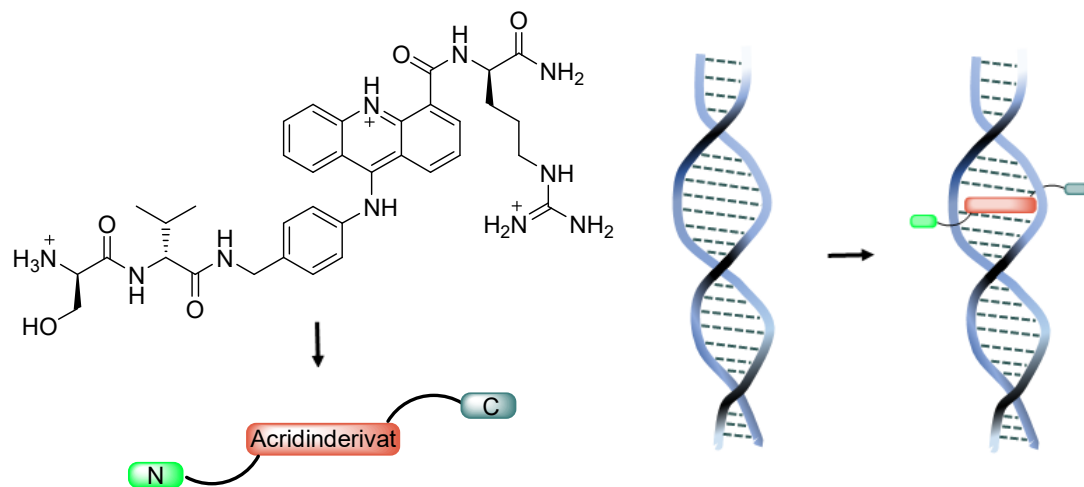


Abbildung 1.21 Peptid-Acridin-Konjugat als Interkalator für RNA-Duplexe. Die Struktur des Peptid-Acridin-Konjugats nach *Beal* und *Gooch* ist links gezeigt und wird in eine schematische Darstellung übertragen. Die Interkalation in die RNA-Duplexstruktur ist rechts gezeigt.

Darüber hinaus zeigten sie eine Interkalation an die *prä-miR-39* aus *C. elegans*, um die minimal benötigte RNA-Struktur festzulegen. Aufbauend auf dieser Studie modifizierten *Yu et al.* amphiphile Peptide mit Acridineinheiten in den Seitenketten der Lysine, sodass diese im pM-Bereich an die Stammschleife (*stem loop*) der *HIV-1 RRE* und *TAR* RNA bindeten.^[115] In einer späteren Studie zeigten *Beal et al.* die Bindung an RNA-Duplexe durch makrozyklische Peptide konjugiert mit Quinilinderivaten. Die erhaltenen K_D -Werte einiger Makrozyklen lagen im μM Bereich.^[116] Darüber hinaus wurde auch die Bindung zur *prä-miR-23b* gezeigt, aber es wurde keine Studien zur Inhibition der *Dicer* Prozession durchgeführt.

1.5 Guanidine an Peptiden und Aminoglykosiden

Aufgrund der hohen Basizität galt Guanidin als eine der stärksten neutralen Basen ($\text{pKs} \sim 13.5$).^[117] Das Strukturelement des Guanidins findet sich in der Nukleinbase Guanin und in der Seitenkette vom Arginin wieder. Unter physiologischen Bedingungen sind Guanidine vollständig protoniert. Guanidine sind symmetrisch und im Gegensatz zu protonierten Aminogruppen planar.^[118] Die positive Ladung der Guanidingruppe markiert die Basis für spezifische Wechselwirkungen zwischen Ligand-Rezeptor und Enzym-Substrat und erfolgt über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischer Wechselwirkungen.^[119] Guanidine spielen eine wichtige Rolle bei RNA bindenden Proteinen,

wie die tRNA Synthetase zur tRNA, ribosomale Proteine mit rRNA und die transkriptionalen Elongationsfaktoren mit der mRNA.^[120]

In den späten 1980er Jahren wurde unabhängig von zwei Gruppen gezeigt, dass das *HIV-1 Tat*-Protein Lipiddoppelschichten durchqueren kann und somit in den Zellkern gelangt.^[121]

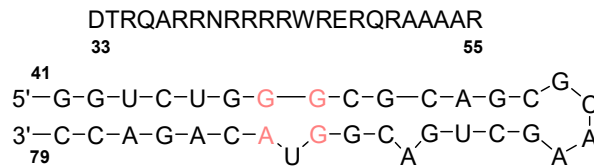


Abbildung 1.22 HIV-1 Rev Peptid und RRE RNA. Das HIV-1 Rev Peptid mit dem Sequenzausschnitt der Aminosäuren 33 – 55 ist oben zu sehen und der zugehörigen RRE RNA mit dem Sequenzabschnitt 41 – 79 ist darunter gezeigt.

Dies war möglich aufgrund des *Tat*-Motivs. Datenbankrecherchen auf Basis des *Tat*-Motivs ergaben mehrere membranpermeable Peptide, die jeweils Arginine enthielten.^[122] Barsoum *et al.* zeigten, dass eine Konjugation der *Tat*-Domäne mit großen Proteinen die Zellpenetration derer förderte.^[123] Die Notwendigkeit der positiven Ladung im *Tat*-Motiv wurde durch Wender *et al.* durch einen Alanin-Scan gezeigt.^[124] Sie belegten in ihrer Studie, dass der Ersatz durch Alanin die Zellpenetration erniedrigt. Ebenso zeigten Fischer *et al.* durch einen Alanin-Scan, dass die Zellpenetration beim Penetratin sinkt.^[125]

Aminoglykoside binden nicht nur an die 16S rRNA, sondern auch an die *HIV-1 TAR* und *RRE RNA*.^[126] Viele Aminoglykoside inhibieren dadurch die Bindung des *Tat*-Proteins an die *TAR* RNA im mM Bereich.^[126b] Neomycin B erwies sich dabei als spezifischer Inhibitor für das Rev-Protein an die *RRE RNA*.^[126a] Basierend auf diesen Erkenntnissen synthetisierten Tor *et al.* verschiedene Guanidinoaminoglykoside, darunter auch Guanidinoneomycin.^[127] Die erhaltenen IC₅₀-Werte für die verschiedenen Aminoglykoside zeigten Potential für eine spezifische RNA Bindung, die in diesem Zusammenhang aber nicht näher untersucht wurde. Tor *et al.* zeigten in weiterführenden Studien, dass Guanidinoneomycin nicht nur an RNA bindet, sondern auch die Zellpenetration erhöhen kann.^[128] Dazu verglichen sie Aminoglykoside, Guanidinoaminoglykoside und Polyarginine, die sie mit einem Fluorophor markierten. Die FACS-Experimente zeigten, dass Guanidinoaminoglykoside ähnlich gut für die zelluläre Aufnahme sind wie Polyarginine.

FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) ist eine Messmethode, die die Analyse von Zellen in einem hohen Tempo ermöglicht. Die fluorophormarkierten Zellen „fließen“ im elektrischen Feld an einem Laser vorbei. Anschließend erfolgt die Sortierung der Zellen basierend auf unterschiedlicher Lichtbrechung und der Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors.^[129]

Zusätzlich zeigten Tor *et al.* in einer weiteren Studie, dass Guanidinoneomycin den Transport von bioaktiven Verbindungen in die Zelle ermöglicht und dabei nur vom Heparan sulfat

abhängig ist.^[130] Dies ist ein Proteoglykan, welches zahlreich auf der Zelloberfläche vertreten ist.

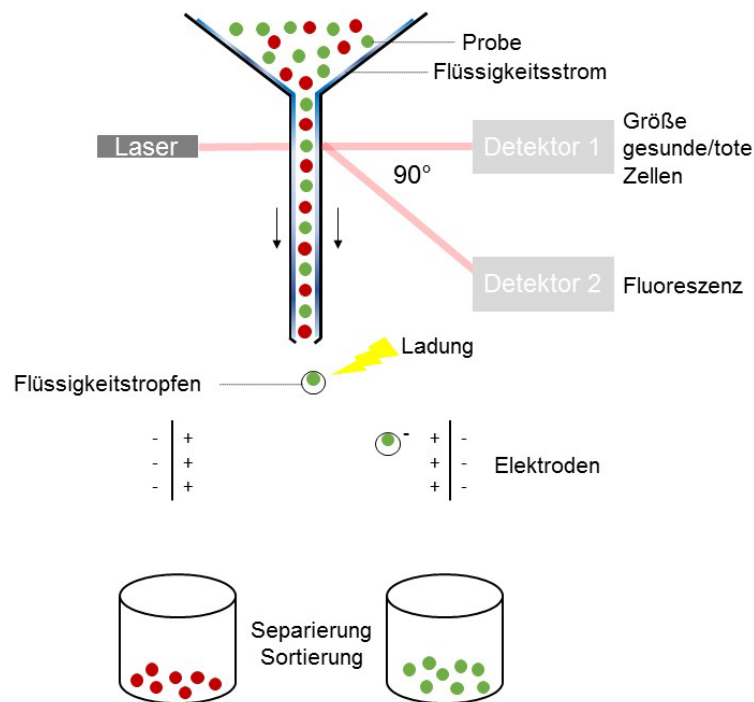


Abbildung 1.23 Schematische Darstellung des FACS-Prinzips. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom mitgezogen und passieren einen Laser. Die Bestimmung der Zellen erfolgt durch beide Detektoren. Die Zellen werden anschließend geladen und im elektrischen Feld abgelenkt und getrennt aufgefangen.

Eine Konjugation von Polyargininen und Aminoglykosiden wurden von *Lapidot* und ihren Mitarbeitern gezeigt.^[131] Die Arbeitsgruppe konjugierte Kanamycin und Gentamycin mit Polyargininen zu Peptidmimetika und zeigten *in vitro* die Bindung zur *HIV-1 TAR* RNA mit K_D -Werten von 20 – 400 nM. Dadurch konnten sie die Bindung des *Tat*-Proteins inhibieren. Der K_D -Wert der nativen *Tat-TAR*-Bindung liegt bei 6 – 12 nM.

Tabelle 1.1 Übersicht einiger ausgewählter CPPs.

Peptid	Klasse	Sequenz
Penetratin	aus Protein	RQIKIWFQNRRMKWKK
Tat Peptid	aus Protein	GRKKRRQRRRPPQ
Transportan	chimäres Peptid	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
Polyarginin	synthetisch	$(R)_n$ $6 < n < 12$
MAP	synthetisch	KLALKLALKALKAAALKLA
R₆W₃	synthetisch	RRWWRRWRR

Mit der Entdeckung, dass das *Tat*-Protein Membranen durchqueren kann und der Charakterisierung der Sequenz der *Tat*-Bindungsdomäne, etablierte sich eine Vielzahl von zellpenetrierender Peptide (*cell-penetrating peptide*, *CPP*, Tabelle 1.1).

CPPs sind kurze, hauptsächlich positiv geladene Peptide und besitzen eine limitierte Toxizität.^[132] Die *CPPs* können in drei Klassen unterteilt werden: Peptide, die aus Proteinen erhalten werden, chimäre Peptide, bestehend aus zwei legierten Peptiden, und vollständig synthetisch erhaltene Peptide (Tabelle 1.1). *CPPs* sind vor allem für die zelluläre Aufnahme von Peptiden, Antisense Oligonukleotiden und Proteinen notwendig.^[133]

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die festphasenbasierte Synthese von funktionalisierten, zyklischen Peptidderivaten als potentielle Inhibitoren der miRNA-Reifung. In diesem Zusammenhang sollten zunächst zyklische Peptidderivate vollständig mittels *SPPS* aus leicht zugänglichen Reagenzien dargestellt werden. Zyklische Peptide sind als potentielle Inhibitoren durchaus von Vorteil, da sie in ihrer Konformation eingeschränkt, im Gegensatz zu ihren linearen Vorläufern proteolysestabiler sind und oft eine höhere Zellpermeabilität aufweisen.^[95a, 95b, 96]

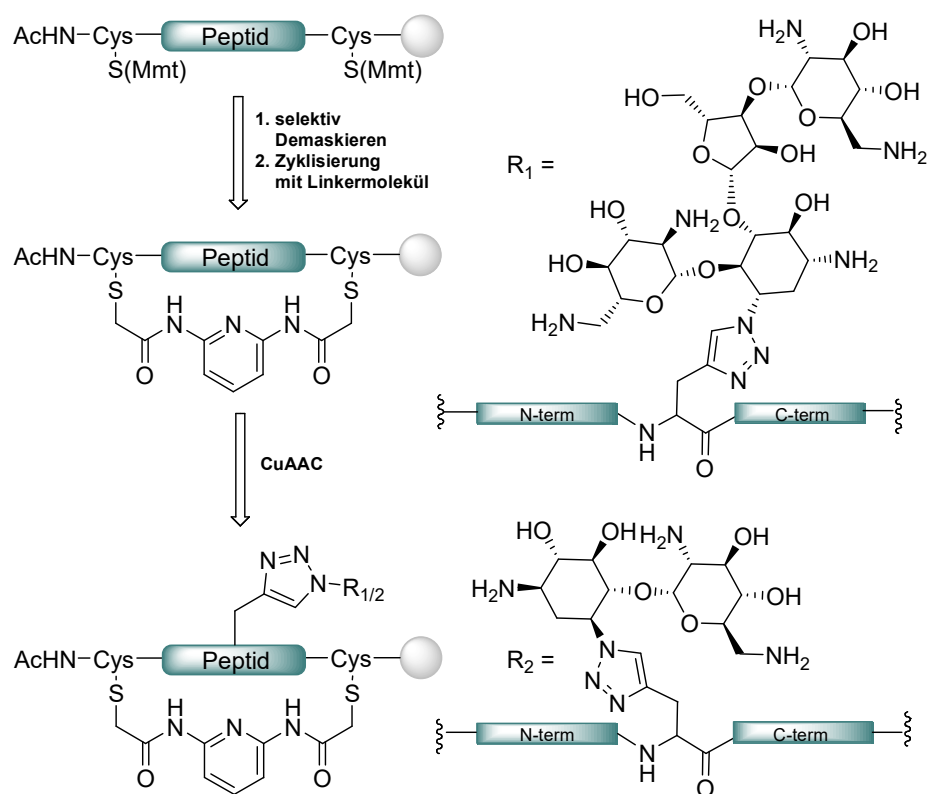


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der geplanten Syntheseroute zur Darstellung von zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugaten.

Die Zyklisierung sollte nicht nach gängigen Zyklisierungsmethoden, wie z. B. der *head-to-tail*-Zyklisierung erfolgen, sondern mittels eines bisfunktionalen Linkermoleküls in den Seitenketten zweier Cysteine.^[97] Dadurch könnte einerseits die Erkennung durch Proteasen

verringert werden, andererseits der Heteroaromat die Affinität zur RNA erhöhen. Die Zyklisierung sollte zudem leicht durchführbar und mit der *SPPS* kombinierbar sein.

Nachfolgend sollten über *CuAAC* an fester Phase zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate dargestellt werden. Zahlreiche Aminoglykoside wirken nicht nur als Antibiotika durch rRNA-Bindung, sondern zeigen auch Potential in der Inhibition anderer RNAs, wie z. B. der miRNA.^[48, 54] Auf Grundlage dessen sollten zunächst Peptide an fester Phase synthetisiert, zyklisiert und im Anschluss daran über *CuAAC* mit den entsprechend dafür modifizierten Aminoglykosiden Neomycin und Neamin umgesetzt und isoliert werden. Die vollständige festphasenbasierte Darstellung solcher Konjugate sollte auch unter dem Gesichtspunkt auf ein mögliches *one bead, one peptide screening* erprobt werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit sollte die Guanidinylierung an fester Phase sein. Guanidinfunktionen können die biologischen und chemischen Eigenschaften von Biomolekülen ändern. So sind Guanidinfunktionen Strukturelement von *CPPs* und guanidinylierte Aminoglykoside weisen eine höhere Affinität zur RNA auf.^[128] Dazu sollten zunächst Peptide an fester Phase mit Hilfe des *Goodman's Reagent* guanidinyliert und isoliert werden.^[119]

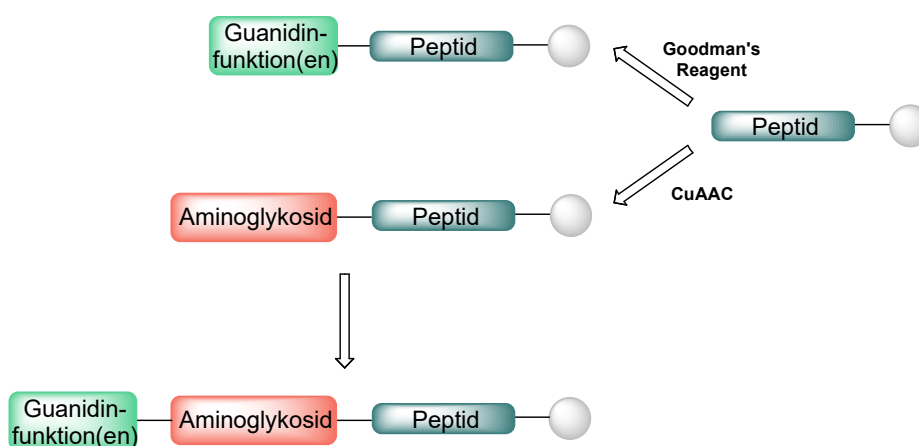


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der geplanten Guanidinylierung an fester Phase an Peptiden und Peptid-Aminoglykosid-Konjugaten.

Nachfolgend sollten die Grenzen der Guanidinylierung an fester Phase bestimmt werden. Dazu sollten verschiedene Peptid- und Peptid-PNA-Rückgrate mit den Aminoglykosiden Neamin und Neomycin zunächst mittels *CuAAC* konjugiert und diese im Anschluss an fester Phase guanidinyliert werden. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob die Struktur des gewählten Rückgrats Einfluss auf die Guanidinylierung hat.

Da *Tor et al.* mittels *FACS*-Experimenten gezeigt haben, dass in Lösung synthetisiertes Guanidinoneomycin ähnlich zellpermeabel wie Polyarginin ist, sollten zu diesem Zweck

fluorophormarkierte Peptid-Aminoglykosid-Konjugate an fester Phase guanidinyliert werden.^[128]

Ein drittes Teilprojekt dieser Arbeit sollte die Funktionalisierung eines kommerziell erhältlichen Polymers für die *SPPS* sein, um nachfolgend eine große Anzahl von verschiedenen Peptiden C-terminal mit einem Fluorophor markieren zu können. Diese Markierung sollte unabhängig von Schutzgruppenstrategien und gängigen Markierungsmethoden mittels *CuAAC* an fester Phase erfolgen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese nicht natürlicher Aminosäuren

Die Seitenketten der natürlichen Aminosäuren besitzen verschiedene funktionelle Gruppen, wie z. B. Amino- und Hydroxylgruppen, Carbonsäurefunktionen und gesättigte Alkylreste. Es existieren jedoch keine Seitenketten mit ungesättigten Resten oder z. B. Aziden.

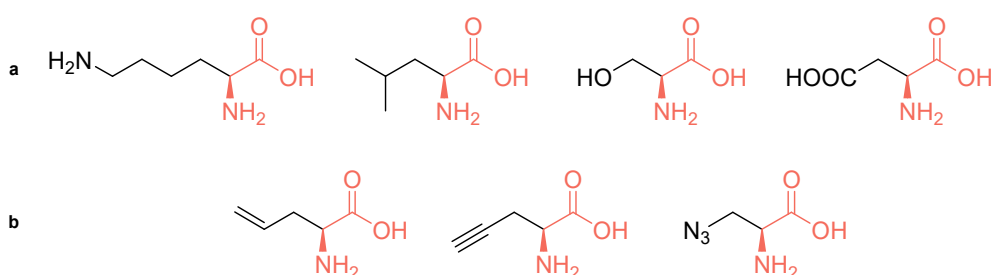


Abbildung 3.1 Übersicht einiger ausgewählter Aminosäuren. a natürliche Aminosäuren (von links nach rechts): L-Lysin, L-Leucin, L-Serin und L-Asparaginsäure. b modifizierte Aminosäuren (von links nach rechts): L-Allylglycin, L-Propargylglycin und L-Azidoalanin.

Um chemische Reaktionen am Peptid unabhängig von der Fmoc/^tBu- oder Boc/Bn-Strategie der *SPPS* durchzuführen, ist eine Funktionalisierung notwendig. Durch Modifizierung der Aminosäuren werden z. B. *RCM* oder *Kreuzmetathese* sowie die *CuAAC* möglich.

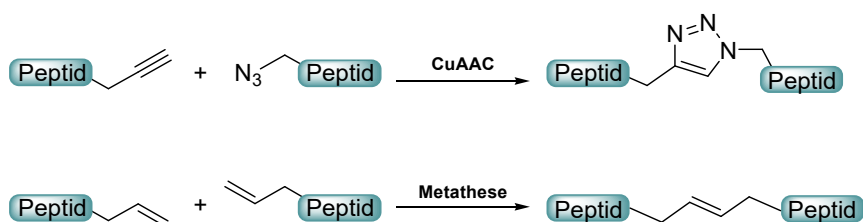


Abbildung 3.2 Vereinfachte Darstellung der Kreuzmetathese und der *CuAAC* an Peptiden.

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits L-Azidoalanin als modifizierte Aminosäure verwendet, um am Peptid eine *CuAAC* durchzuführen.^[134] Das Azid erwies sich nicht als geeignete funktionelle Gruppe, da diese benötigte Reagenzien in Folgereaktionen nicht

toleriert. Um die CuAAC als Reaktion weiterhin zu verwenden, wurde eine alkinmodifizierte Aminosäure synthetisiert.

Die Arbeitsgruppe um Corey zeigte die enantioselektive Synthese von modifizierten Glycinen mit Hilfe eines Katalysators.^[135] Dabei stellt dieser Cinchonidin-Alkaloid-Katalysator einen effektiven Phasentransferkatalysator dar, der eine asymmetrische Alkylierung am α -Kohlenstoff von Glycin ermöglicht.

Im ersten Schritt wurde Cinchonidin in Tetrahydrofuran suspendiert und Chloromethylantracen addiert (Abbildung 3.3). Die Suspension wurde unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlen aus Diethylether präzipitiert. Der erhaltene Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und anschließend getrocknet. Es wurden 62 % eines gelben Feststoffes erhalten, der ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

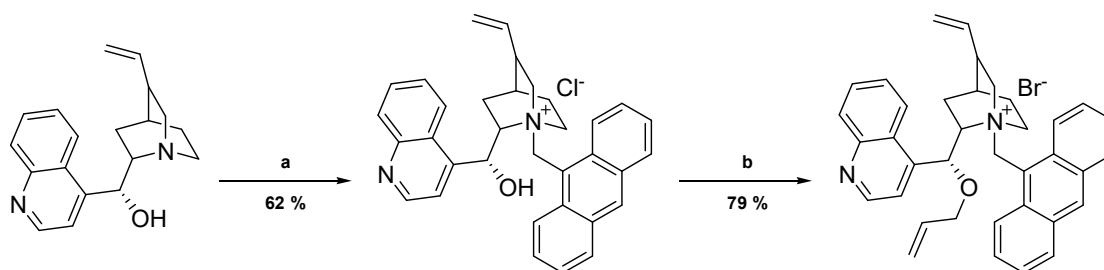


Abbildung 3.3 Syntheseroute zur Darstellung von *O*-(9)-Allyl-*N*-(9)-anthracylmethylcinchonidinumbromid nach Corey et al.. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 1.03 äq. Chloromethylantracen, Tetrahydrofuran, Reflux, 5 h. b) 3.1 äq. Allylbromid, 4.7 äq. 50 %ige KOH-Lösung, CH₂Cl₂, RT, 4 h.

In einer nukleophilen Veretherung wurde die freie Hydroxygruppe mit Kaliumhydroxidlösung deprotoniert und anschließend mit Allylbromid alkyliert. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss mit Wasser verdünnt, mit Dichlormethan extrahiert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen, mit Diethylether überschichtet und das Produkt durch Kristallisation als orange-brauner Feststoff in einer Ausbeute von 79 % erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mit NMR-Spektroskopie und ESI-MS. Das erhaltene Massenspektrum zeigt geringe Verunreinigungen durch das Ausgangssubstrat Cinchonidin, jedoch hat dieses keinen Einfluss auf die nachfolgende Alkylierung des Glycins. Die tetraedrische Anordnung der Ringatome am quartären Amin führt zu einer gezielten Ausrichtung der positiven Ladung, sodass ein rigider enantioselektiver Katalysator entsteht.

Um Glycin mit Hilfe des hergestellten Katalysators enantioselektiv zu alkylieren, wurde mit α,α -Dichlordiphenylmethan die Aminogruppe des Glycins unter Bildung einer Schiffsbasis maskiert und die Acidität des α -Wasserstoffs am Glycin erhöht.^[136]

Dazu wurde Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid in trockenem Acetonitril suspendiert und mit trockenem Triethylamin versetzt (Abbildung 3.4). Unter Rückfluss wurde anschließend

α,α -Dichlordiphenylmethan hinzugeetropt. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt und unter verminderten Druck abfiltriert. Die erhaltene Lösung wurde eingeeengt und das Produkt ohne weitere Aufreinigung charakterisiert. Es wurden 62 % eines fahlgelben Feststoffes erhalten. Triethylamin wird als Base bei dieser Reaktion zur Neutralisation von Chlorwasserstoff verwendet. Das so entstehende quartäre organische Ammoniumsalz löst sich ebenfalls in Acetonitril, ist nur schwer vom Produkt abzutrennen und verschlechtert insofern die Ausbeuten, da weitestgehend auf Waschen des Rückstandes verzichtet werden muss. Alternativ könnte statt dem α,α -Dichlordiphenylmethan Benzophenonimin verwendet werden.^[137] Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid wird hierfür mit Benzophenonimin in Dichlormethan gelöst und für 24 Stunden gerührt. Das entstandene Ammoniumchlorid wird anschließend abfiltriert und *N*-Benzophenon-glycin-imin-*tert*-butylester durch Kristallisation erhalten.

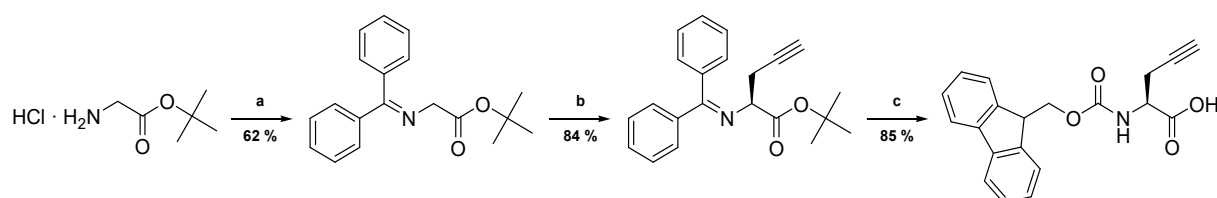


Abbildung 3.4 Übersicht der Syntheseroute zur Darstellung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin ausgehend von Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 3 äq. Et₃N, 1 äq. α,α -Dichlordiphenylmethan, MeCN, Reflux, 3.5 h. b) 10 mol% O-(9)-Allyl-N-(9)-anthracylmethylcinchonidiniumbromid, 5 äq. Propargylbromid, 8.8 äq. CsOH·H₂O, CH₂Cl₂, -78 °C – RT, über Nacht. c) 6 M HCl, THF, RT, 5 h; 1 äq. Fmoc-Succinimid, 2.5 äq. NaHCO₃, H₂O/THF, 0 °C – RT, 2 d.

In der enantioselektiven Alkylierung zeigte die Arbeitsgruppe um *Corey*, dass die Enantioselektivität bei tiefen Temperaturen besonders groß ist. Daher wurde *N*-Benzophenon-glycin-imin-*tert*-butylester in trockenem Dichlormethan gelöst und auf -78 bis -82 °C gekühlt. Nachfolgend wurden der enantioselektive Katalysator und Cäsiumhydroxid Monohydrat hinzugeben. Im Anschluss wurde Propargylbromid langsam hinzugeetropt, sodass die Temperatur konstant blieb. Die Reaktion wurde über Nacht bei -78 °C gerührt und anschließend mit Diethylether verdünnt und gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und als gelbes Öl in einer Ausbeute von 84 % erhalten.

Die Demaskierung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgte anschließend mit einem Gemisch aus Tetrahydrofuran (THF) und sechs molarer Salzsäure bei Raumtemperatur. Das erhaltene L-Propargylglycin Hydrochlorid wurde ohne Aufreinigung *N*-terminal mit der Fmoc-Schutzgruppe maskiert. Es wurden nach säulenchromatographischer Aufreinigung 85 % Fmoc-L-propargylglycin erhalten. Die Syntheseroute nach *Corey et al.* ergibt 44 % Ausbeute über drei isolierte Stufen des Glycinderivates.

Die Arbeitsgruppe um *Granja* zeigte eine andere Möglichkeit zur Darstellung von L-Propargylglycin.^[138] In einer Malonestersynthese wurde der azide α -Wasserstoff des Diethyl-2-acetamidomalonats deprotoniert und anschließend erfolgte eine nukleophile Substitution am partiell positiv geladenen Kohlenstoff des Propargylbromids (Abbildung 3.5).

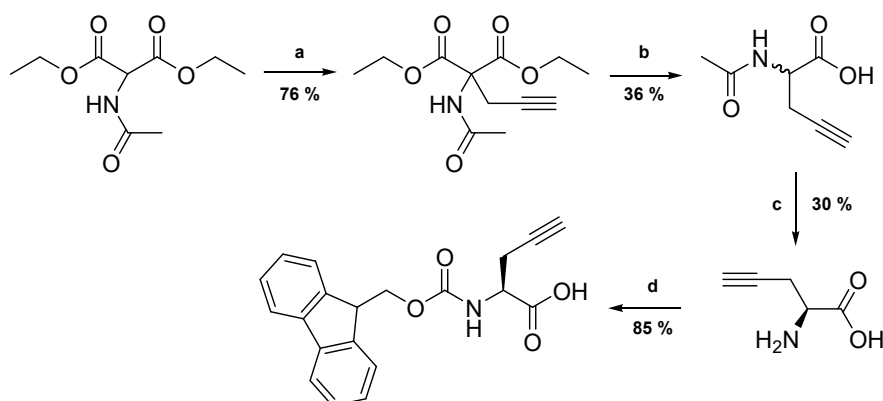


Abbildung 3.5 Übersicht der Syntheseroute zur Darstellung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin über L-propargylglycin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 1 äq. KO^tBu, Dioxan, Reflux, 2.5 h; 1 äq. Propargylbromid, Reflux, 11 h. b) 2 M KOH, H₂O/EtOH, RT, 7 d; pH 5, H₂O, Reflux, 5 h. c) Phosphatpuffer pH 7.5, *Acylase I*, CoCl₂, 37 °C, 2 d. d) 1 äq. Fmoc-OSu, 2.5 äq. NaHCO₃, H₂O/THF, 0 °C – RT, 24 h.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde Diethyl-2-acetamido-2-propynylmalonat in einer Ausbeute von 76 % als weißer Feststoff erhalten. Im Folgenden wurde Diethyl-2-acetamido-2-propynylmalonat mit einer zwei molaren Kaliumhydroxidlösung und etwas Ethanol versetzt. In einer Verseifungsreaktion wurden beide Esterfunktionen hydrolysiert und das erhaltene Zwischenprodukt mit sechs molarer Salzsäure behandelt und unter Rückfluss zum *N*-Acetylpropargylglycin decarboxyliert. Es wurde eine Ausbeute von 36 % erhalten.

Beide Reaktionen erfolgten ohne Enantioselektivität. In einer enzymatischen Reaktion mit der *Acylase I Aspergillus melleus* wurde das enantiomerenreine L-Propargylglycin erhalten. Durch Zugabe von Cobalt-(II)-chlorid erfolgt die Aktivierung des enzymatischen Zentrums.^[139] Das erhaltene Rohprodukt wurde nach entsprechender Vorschrift angesäuert, über Aktivkohle filtriert, nochmals angesäuert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Das L-Propargylglycin verbleibt dabei in der wässrigen Phase und das entsprechende D-Acetylpropargylglycin liegt in der organischen Phase vor. Im Anschluss wurde mittels Ionenaustauschchromatographie die wässrige Phase aufgereinigt und das Produkt in einer Ausbeute von 30 % als weißer Feststoff erhalten. Das isolierte L-Propargylglycin wurde mit Fmoc-succinimid (Fmoc-OSu) maskiert und in einer Ausbeute von 85 % erhalten. Die Syntheseroute nach *Granja et al.* und die anschließende Fmoc-Maskierung liefern eine Ausbeute von 7 % über vier Stufen.

Verglichen mit der Gesamtausbeute der Syntheseroute nach *Corey et al.*, ist die Verwendung eines enantioselektiven Katalysators effizienter. Sowohl die Verseifung und die

Decarboxylierung als auch die enzymatische Demaskierung verliefen in schlechter Ausbeute. Da D- und L-Derivate im Gemisch vorliegen, kann kein quantitativer Umsatz erzielt werden. Auch wenn die Gesamtausbeute geringer ist, bietet diese Syntheseroute Vorteile, da hauptsächlich wässrige Lösungen und Puffer verwendet werden.

Glycin wurde ebenfalls mittels beider Routen mit einem Pentinylrest modifiziert. Dazu wurde zunächst Pent-4-ynylmethansulfonat hergestellt. Es wurde Pent-4-in-1-ol in Dichlormethan verdünnt und mit Triethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf -78°C gekühlt und langsam Methansulfonylchlorid hinzugetropft. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurden 83 % eines blassgelben Öls erhalten.

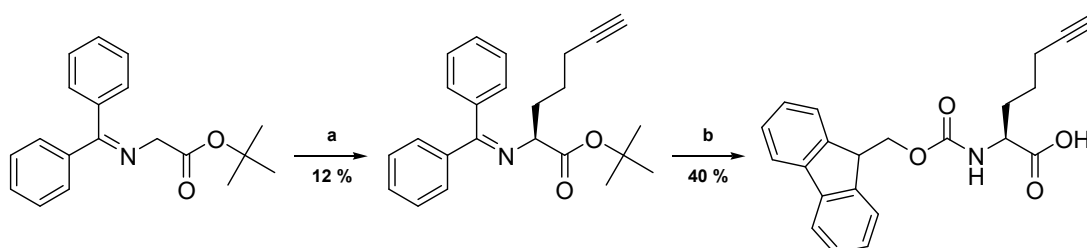


Abbildung 3.6 Übersicht der Syntheseroute zur Darstellung von **N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-pentinyglycin**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: b) 10 mol% O-(9)-Allyl-N-(9)-anthracylmethylcinchonidiniumbromid, 5 äq. Pent-4-ynylmethansulfonat, 8.8 äq. $\text{CsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , -78°C – RT, über Nacht. c) 6 M HCl, THF, RT, 5 h; 1 äq. Fmoc-OSu, 2.5 äq. NaHCO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, 0°C – RT, 2 d.

In der enantioselektiv katalysierten Reaktion wurde nach gleicher Vorschrift nur 12 % Ausbeute erhalten. Obwohl die Gruppe um Corey verschiedene Modifizierungen mit vergleichbaren Resten zeigte, wurden höhere Ausbeuten erzielt. Die nachfolgende Fmoc-Maskierung ergab eine Ausbeute von 40 %. Aufgrund dieser Ausbeuten wurde die Vergleichssynthese nach *Granja et al.* durchgeführt.

Bei der C-C-Bindungsknüpfung von Diethyl-2-acetamidomalonat mit Pent-4-ynylmethansulfonat wurden 44 % in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

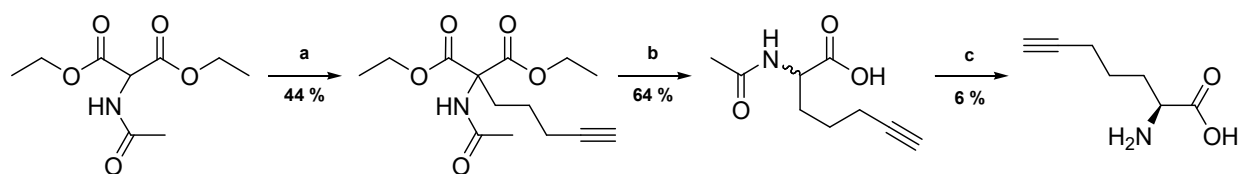


Abbildung 3.7 Übersicht der Syntheseroute zur Darstellung von **L-Pentinyglycin**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 1 äq. KO^tBu , Dioxan, Reflux, 2.5 h; 1 äq. Pent-4-ynylmethansulfonat, Reflux, 12 h. b) 2 M KOH, $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, RT, 7 d; pH 5, H_2O , Reflux, 5 h. c) Phosphatpuffer pH 7.5, *Acylase I*, CoCl_2 , 37°C , 2 d.

Es erfolgte zunächst die Verseifung des Esters und anschließend die Decarboxylierung. *N*-Acetylpentinylglycin wurde nach entsprechender Aufreinigung in einer Ausbeute 64 % in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

Die Demaskierung mit Hilfe der *Acylase I Aspergillus melleus* zu L-Pentinylglycin ergab eine Ausbeute von 6 %. Die Gesamtausbeute dieser Reaktion beträgt 2 %. Aufgrund der deutlich geringeren Ausbeuten wurden beide Syntheserouten nicht weiterverfolgt.

3.2 Synthese von 3-Azido-Neamin und 3-Azido-Neomycin

Da die *CuAAC* an terminalen Alkinen und Aziden durchgeführt wird, wurde die Azidfunktion durch regioselektiven Diazotransfer am C3-Atom des 2-Desoxystreptaminring (2-DOS) des Neamins und Neomycins eingeführt.^[140] Dazu wurde zuerst Neomycin in einer methanolischen Glykosidspaltung mit Salzsäure zu Neamin unter Rückfluss abgebaut.^[54]

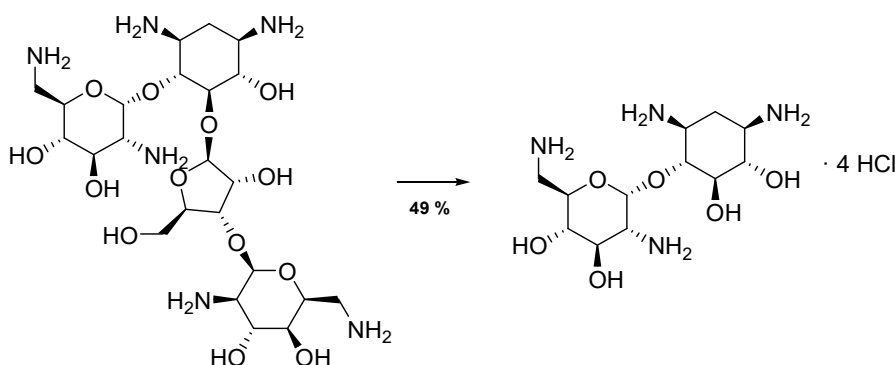


Abbildung 3.8 Schema der Reaktion von Neomycin B zu Neamin Hydrochlorid. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 12 M HCl, MeOH, Reflux, 22 h.

Neamin Hydrochlorid wurde als lachsfarbener Feststoff in einer Ausbeute von 49 % erhalten. Der Diazotransfer wurde mit Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid realisiert. Dieses wurde zuvor aus Natriumazid, Sulfonylchlorid und Imidazol hergestellt.^[141] Um dieses Azid lagerbar zu machen, wurde es in das Hydrochlorid überführt und in einer Ausbeute von 56 % als weißer Feststoff erhalten.

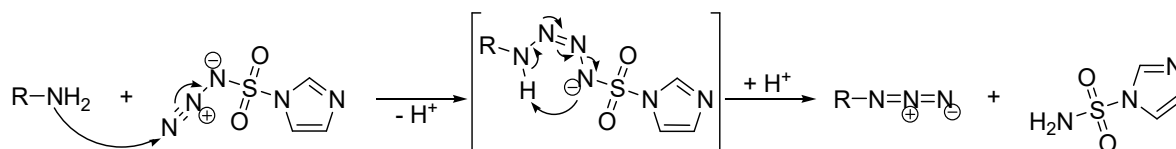


Abbildung 3.9 Allgemeiner Reaktionsmechanismus des kupferfreien Diazotransfers mit Hilfe von Imidazol-1-sulfonylazid.

Der durch *Herrmann et al.* gezeigte regioselektive Diazotransfer an der C3-Position des 2-DOS-Rings erfolgt im Gegensatz zu anderen Diazotransferreaktionen ohne Kupfer(II).^[140] Die Regioselektivität wurde hier lediglich durch Einstellen des pH-Wertes erreicht.

Die Aminofunktion an der C3-Position des 2-DOS hat einen pK_s -Wert von 5.74 und ist damit deutlich geringer als der anderen Aminofunktionen (Abbildung 3.10).^[140] Der pH-Wert wird in dieser Reaktion bis Reaktionsabbruch konstant auf pH 6.6 eingestellt.

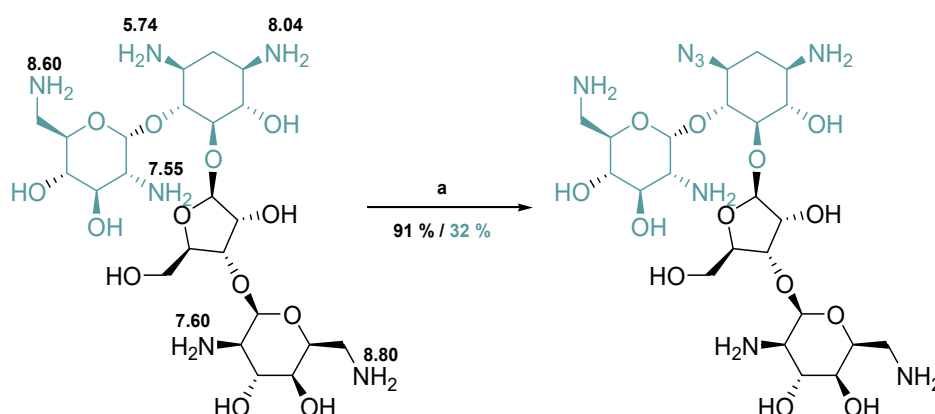


Abbildung 3.10 Selektiver Diazotransfer am C3 des Neomycins und Neamins (blau). Für alle Aminofunktionen sind die jeweiligen pK_s -Werte angegeben. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 8 äq. Imidazolsulfurylazid Hydrochlorid pH 6.6, H_2O , 1 – 3 d.

Auf diese Weise wurde für 3-Azido-Neomycin eine Ausbeute von 91 % und für 3-Azido-Neamin 32 % erzielt. Schwankungen im pH-Wert bewirkten, dass nicht nur die Azidgruppe an der C3-Position eingeführt wurde. Bei der Reaktionskontrolle mittels UPLC-MS konnten Nebenprodukte mit zwei und drei Azidfunktionen detektiert werden. Die entstandenen Nebenprodukte wurden anschließend säulenchromatographisch vom Produkt abgetrennt.

3.3 Synthese von stabilisierenden Liganden in der CuAAC

Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, werden 1,2,3-Triazole mittels CuAAC dargestellt und es wurde gezeigt, dass TBTA für die Stabilisierung von Kupfer(I) geeignet ist.^[71] Ausgangsstoff bei der Darstellung von TBTA ist Benzylazid, welches zunächst aus Benzylbromid und Natriumazid hergestellt und in einer Ausbeute von 84 % als farbloses Öl erhalten wurde.^[142]

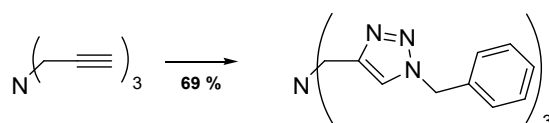


Abbildung 3.11 Darstellung von TBTA ausgehend von Tripropargylamin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 4.5 äq. Benzylazid, 1 äq. 2,6-Lutidin, 1.3 mol% (bezogen auf die Totalalkinanzahl) $Cu(MeCN)_4PF_6$, MeCN, 0 °C – RT, 5 d.

Benzylazid wurde mit Tripropargylamin unter Verwendung von 2,6-Lutidin und Tetrakis(acetonitril)-Kupfer(I)-hexafluorophosphat in Acetonitril in einer *CuAAC* dargestellt und in einer Ausbeute von 69 % als weißer Feststoff erhalten (Abbildung 3.11).

Da TBTA in vielen Lösungsmitteln, jedoch schlecht in Wasser löslich ist, wird die *CuAAC* in Wasser mit Tris[(1-hydroxypropyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (THPTA) als Ligand durchgeführt.^[143]

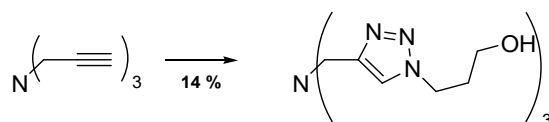


Abbildung 3.12 Darstellung von THPTA ausgehend von Tripropargylamin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 4.5 äq. 3-Azido-propan-1-ol, 1 äq. 2,6-Lutidin, 1.3 mol% (bezogen auf die Totalalkinanzahl) $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$, MeCN, 0 °C – RT, 4 d.

Dazu wurde zunächst 3-Azido-propan-1-ol ausgehend von 3-Chloropropan-1-ol synthetisiert und THPTA nach gleicher Vorschrift wie TBTA in einer *CuAAC* dargestellt.

3.4 Synthese zyklischer Peptide an fester Phase

Wie in Kapitel 1.4.4 beschrieben, lassen sich Peptide sowohl in Lösung als auch an fester Phase zyklisieren. Die Gruppe um *Meloen* beschrieb die Zyklisierung von Peptiden mit Cysteinen in verschiedener Anzahl mit Bromiden in Lösung.^[144] Dabei wurden in kürzester Zeit quantitative Ausbeuten erhalten.

In vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine Zyklisierung an fester Phase mit den Seitenketten der Cysteine und *N,N'*-Di-chloracetyl-2,6-diaminopyridin möglich ist.

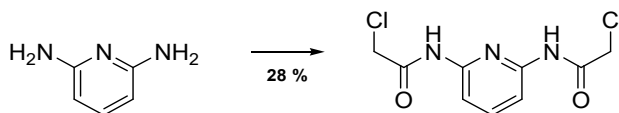


Abbildung 3.13 Synthese von *N,N'*-Di-chloracetyl-2,6-diaminopyridin ausgehend von 1,6-Diaminopyridin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 1.5 äq. Et_3N , 2.5 äq. Chloracetylchlorid, Toluol, RT, 3.5 h.

Zunächst wurde *N,N'*-Di-chloracetyl-2,6-diaminopyridin (Linker) ausgehend von 1,6-Diaminopyridin und Chloracetylchlorid in *N,N*-Dimethylformamid umgesetzt und nach entsprechender Aufarbeitung als rostbraune Nadeln in einer Ausbeute von 28 % erhalten.^[52]

Die vorangegangenen Arbeiten zeigten, dass die Zyklisierung an fester Phase nicht quantitativ verlief. So wurden neben dem dialkylierten Zielprodukt, auch monoalkylierte und Dimere erhalten (Abbildung 3.14).

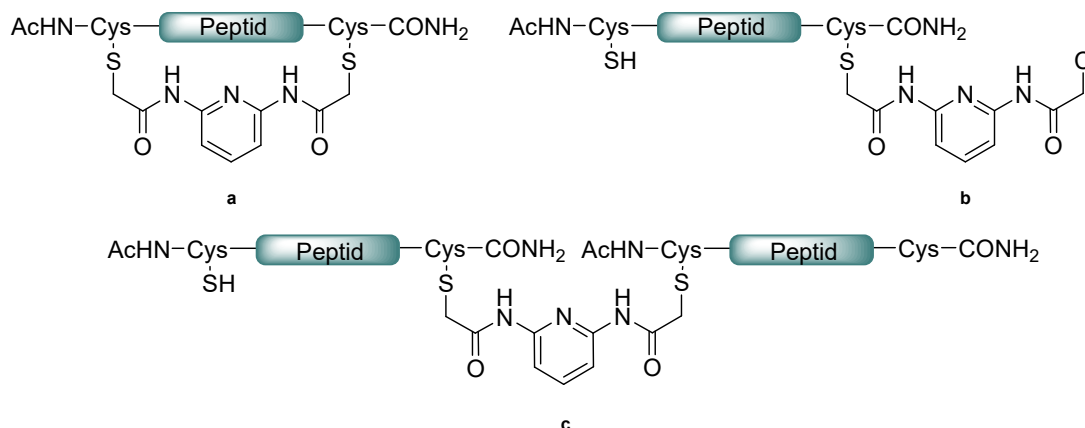


Abbildung 3.14 Übersicht der erhaltenen Produkte nach Zyklisierung an fester Phase. a) dialkyliertes Zielprodukt; b) monoalkyliertes Produkt; c) Dimer aus zwei Peptiden und einem Linkermolekül.

Eine Optimierung der Zyklisierung an fester Phase stand deshalb zunächst im Vordergrund. Dazu wurde ein Hexamer ($\text{AcHN-CSYRHC-CONH}_2$, linearer Vorläufer) nach allgemeiner Vorschrift der manuellen Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Die Seitenkette der Cysteine war mit der Monomethoxytrityl-Schutzgruppe (Mmt) maskiert und diese besitzt im Vergleich zu anderen Schutzgruppen eine deutlich abgestufte Säurelabilität.

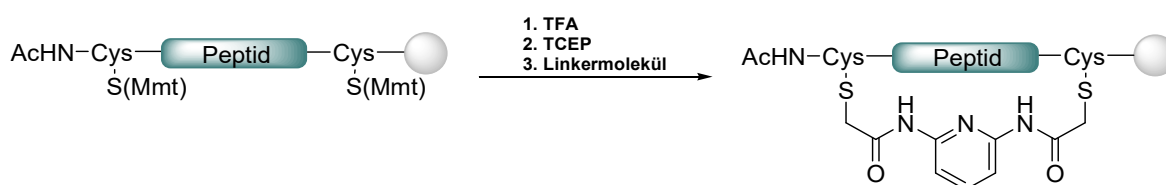


Abbildung 3.15 allgemeines Syntheseschema der Zyklisierung an fester Phase.

Wie das vereinfachte Syntheseschema zur Zyklisierung an fester Phase zeigt, wurde das Testpeptid mit einer 3 %igen Lösung von Trifluoressigsäure (TFA) in einem Dichlormethan-Triisopropylsilan-Gemisch (95:5) behandelt und die beiden Thiole an den Cysteinen demaskiert. Freie Thiole in Peptiden oder Proteinen können zu Disulfidbrücken oxidieren und formen und stabilisieren dadurch Tertiärstrukturen der Peptide und Proteine. Um gebildete Disulfidbrücken zu reduzieren, wurde das Peptid mit einer Lösung von Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in *N,N*-Dimethylformamid behandelt.^[145] Die Zyklisierung erfolgte nachfolgend in einer nukleophilen Thioetherreaktion mit dem Linker in einem *N,N*-Dimethylformamid-Wasser-Gemisch.

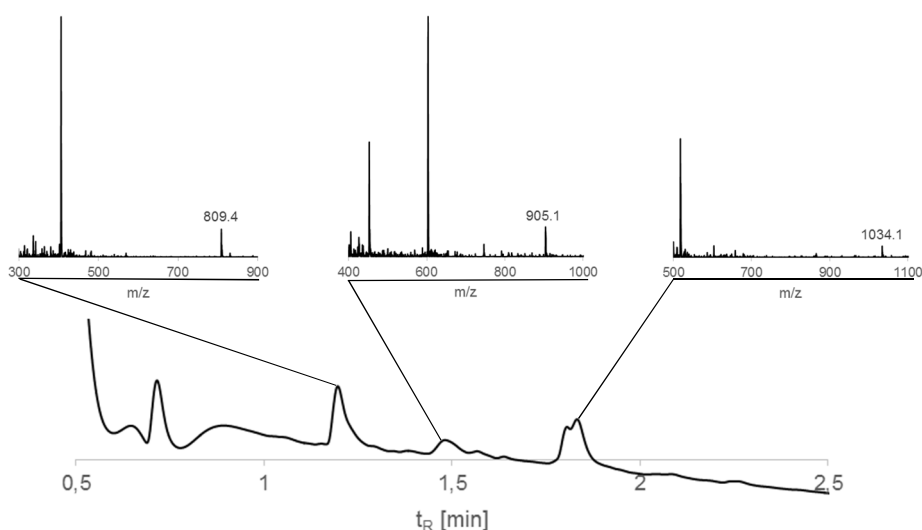


Abbildung 3.16 Ausschnitt des UV-Chromatogramms bei 225 nm der Testspaltung nach der Zyklisierungsreaktion mit den jeweiligen Massenspektren. Es wurde ein Produktgemisch aus linearen Vorläufer ($[M+H]^+_{\text{gef}} = 809.4$ / $[M+H]^+_{\text{ber}} = 809.3$), monoalkyliertem Peptid ($[M+H]^+_{\text{gef}} = 1034.1$ / $[M+H]^+_{\text{ber}} = 1034.4$) und einem Dimer ($[M+2H]^{2+}_{\text{gef}} = 905.1$ / $[M+2H]^{2+}_{\text{ber}} = 903.9$) erhalten.

In dem erhaltenen Chromatogramm konnte das gewünschte zyklische Peptid anhand der erhaltenen Signale nicht gefunden werden. Es wurden lediglich Massen gefunden, die dem linearen Vorläuferpeptid, dem monoalkylierten Peptid und einem Dimer entsprechen. Die Zyklisierung an fester Phase war somit nicht erfolgreich.

Vergleichsweise wurden drei weitere Peptide in verschiedenen Längen (7 – 10 Aminosäuren) synthetisiert. Es folgte die Reduktion der Disulfide mit TCEP und die Zyklisierung mit dem Linkermolekül. Auch diese zeigten bei der Reaktionskontrolle nur wenig gebildetes Produkt. Die detektierten Signale des Chromatogramms nach Testspaltung zeigten auch hier u. a. das monoalkylierte Produkt und das lineare Vorläuferpeptid.

Aus diesem Grund wurden die Reaktionsbedingungen der Zyklisierung geändert. Bei der Alkylierung von Thiolverbindungen wird unter Zugabe von Basen das Thiolation gebildet und dient als Nukleophil in dieser Veretherungsreaktion. Da die Reaktion in *N,N*-Dimethylformamid erfolgte, wurde Triethylamin als Base addiert. Des Weiteren wurde Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) für einen *in situ* Finkelstein-Austausch verwendet.

Das vorher synthetisierte Peptid **P1** ($^{\text{AcHN}}\text{CWHYRC}^{\text{CONH}_2}$) wurde zur Zyklisierung mit einer Lösung aus Linker, Triethylamin und katalytischen Mengen TBAB in *N,N*-Dimethylformamid versetzt und über Nacht geschüttelt.

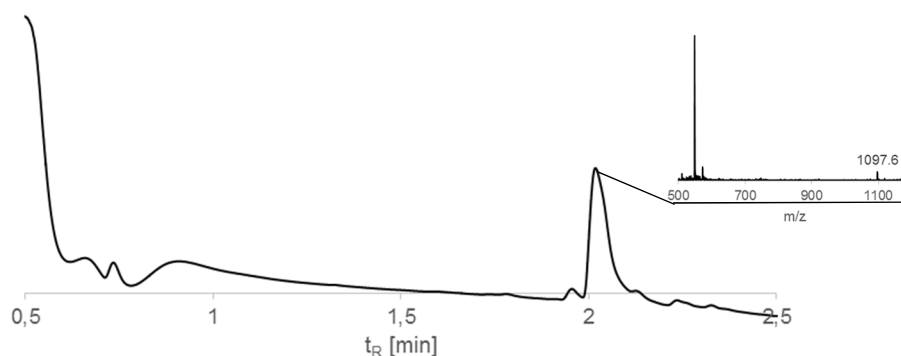


Abbildung 3.17 Ausschnitt des UV-Chromatogramm bei 225 nm der Testspaltung nach erfolgreicher Zyklisierungsreaktion des Peptids **cP1**. Es wurde das zyklische Peptid als Hauptprodukt ($[M+H]^+_{\text{gef}} = 1097.6$ / $[M+H]^+_{\text{ber}} = 1097.4$) erhalten.

Die Reaktionskontrolle mittels Testspaltung zeigte, dass das zyklisierte Peptid **cP1** ($[M+H]^+_{\text{gef}} = 1097.6$ / $[M+H]^+_{\text{ber}} = 1097.4$) als Hauptprodukt gebildet wurde. Das Peptid **cP1** wurde anschließend vom Harz freigesetzt und mit Hilfe semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Die Abbildung 3.18 zeigt die Struktur des zyklischen Peptids.

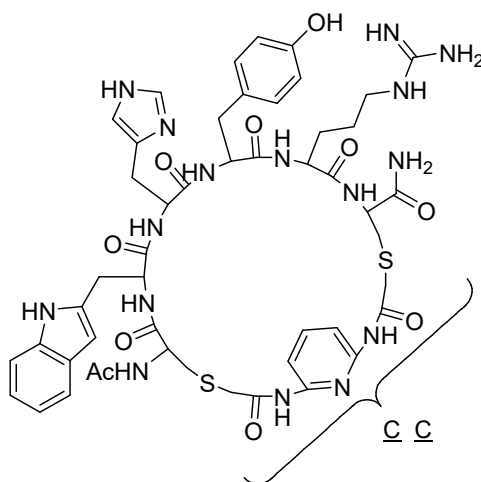


Abbildung 3.18 Struktur des zyklischen Peptids **cP1** mit Linkermolekül. C C gibt die Position der Zyklisierung an.

Unter Verwendung der gleichen Synthesevorschrift wurden fünf weitere Peptide in verschiedenen Längen an fester Phase synthetisiert, zyklisiert und nach entsprechender Aufarbeitung isoliert.

Tabelle 3.1 **Übersicht der isolierten zyklischen Peptide.** Die Tabelle zeigt die Peptide mit der jeweiligen Sequenz, Ringgröße (Anzahl der Aminosäuren inklusive Cystein) und isolierter Ausbeute.

Nummer	Sequenz	Ringgröße	Ausbeute [%]
cP1	AcHN <u>C</u> WHYR <u>C</u> CONH ₂	6	8.1
cP2	AcHN <u>C</u> KRYSH <u>C</u> CONH ₂	7	3.8
cP3	AcHN <u>C</u> RSYHWKK <u>C</u> CONH ₂	9	1.4
cP4	AcHN <u>C</u> KH <u>C</u> CONH ₂	4	1.7
cP5	AcHN <u>C</u> RWSC <u>C</u> CONH ₂	5	3.1

Da die Peptide in verschiedenen Längen erfolgreich isoliert werden konnten, wurde diese Methode auf Peptide mit Alkineinheiten angewendet. Dazu wurden fünf Peptide mit jeweils einem Propargylglycin in verschiedenen Längen mit Hilfe der *SPPS* synthetisiert und nach entsprechender Vorschrift zyklisiert. Im Anschluss wurden diese vom Harz freigesetzt und mit semi-präparativer HPLC aufgereinigt.

Tabelle 3.2 **Übersicht der isolierten zyklischen Peptide.** Die Aminosäure Propargylglycin mit Alkinfunktion wird mit „Pra“ abgekürzt.

Nummer	Sequenz	Ringgröße	Ausbeute [%]
cP6	AcHN <u>C</u> Y-Pra-SRK <u>C</u> CONH ₂	7	6.4
cP7	AcHN <u>C</u> WK-Pra-YH <u>C</u> CONH ₂	7	4.3
cP8	AcHN <u>C</u> Y-Pra-S <u>C</u> CONH ₂	5	3.3
cP9	AcHN <u>C</u> -Pra-YH <u>C</u> CONH ₂	5	4.4
cP10	AcHN <u>C</u> Y-Pra-RH <u>C</u> CONH ₂	6	7.3

Wie die Tabelle 3.2 zeigt, ist diese Zyklisierungsmethode ebenfalls mit Peptiden, die Alkine enthalten möglich. Darüber hinaus wurden für die verschiedenen Peptide ähnliche Ausbeuten erhalten. Durch den Einsatz von terminalen Alkinfunktionen wird die *CuAAC* an fester Phase ermöglicht. Dazu wurden zunächst nach Vorschrift fünf verschiedene Peptide in variierenden Längen und mit unterschiedlichen Positionen der Cysteine synthetisiert und zyklisiert. Zur Reaktionskontrolle wurde eine Testspaltung vorgenommen.

Die *CuAAC* erfolgte mit zehn Äquivalenten 3-Azido-Neomycin oder 3-Azido-Neamin, zehn Äquivalenten TBTA, zehn Äquivalenten Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat und 20 Äquivalenten Natriumascorbat in einem entgasten *N,N*-Dimethylformamid-Wasser-Gemisch für drei Tage bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend aufgearbeitet.

Auf diese Weise können zyklische Peptide und Aminoglykoside über 1,2,3-Triazole konjugiert werden und bilden somit zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate.

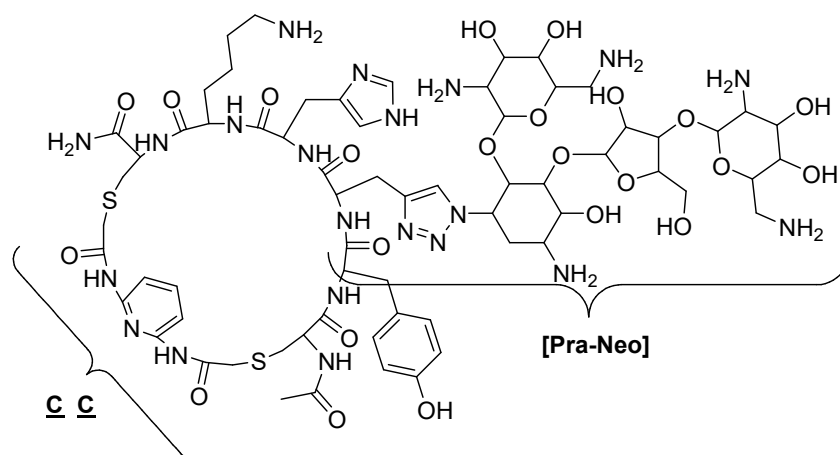


Abbildung 3.19 Struktur des zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugats. [Pra-Neo] beschreibt die Knüpfung mittels *CuAAC* zwischen Propargylglycine und 3-Azido-Neomycin.

Es wurden fünf zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate vollständig an fester Phase dargestellt, die die nachfolgende Tabelle 3.3 zusammenfasst.

Tabelle 3.3 Übersicht der isolierten zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugate. Die Tabelle zeigt die Peptid-Aminoglykosid-Konjugate mit der jeweiligen Sequenz, Ringgröße (Anzahl der Aminosäuren inklusive Cystein) und isolierter Ausbeute.

Nummer	Sequenz	Ringgröße	Ausbeute [%]
cP-A11	AcHN-CY[Pra-Neo]SC-CONH ₂	5	0.6
cP-A12	AcHNRRRCYK[Pra-Neo]C-CONH ₂	5	3.2
cP-A13	AcHNRRRCYK[Pra-Neo]C-CONH ₂	5	4.6
cP-A14	AcHN-C[Pra-Neo]SYWC-CONH ₂	6	0.5
cP-A15	AcHNCHY[Pra-Neo]C-CONH ₂	5	5.9

Die erhaltenen Ausbeuten nach der *CuAAC* sind zum Teil deutlich geringer und zeigen keine deutliche Tendenz in Bezug auf Position der Alkylgruppe oder verwendetes Aminoglykosid. Durch verbreiterte Elution der zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugate bei der Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC wurden verunreinigte Produktfraktionen erhalten. Des Weiteren wurden Fraktionen isoliert, die in der Masse dem zyklischen Vorläuferpeptid entsprachen. Das lässt darauf schließen, dass die *CuAAC* an fester Phase in schlechteren Ausbeuten verlief. Mögliche Ursache ist die schlechte Löslichkeit von TBTA in Wasser. Die *CuAAC* wurde bei diesen Konjugaten in einem *N,N*-Dimethylformamid-Wasser-Gemisch durchgeführt, da die verwendeten Aminoglykoside wasserlöslich sind.

Anhand dieser Ergebnisse wurden vier weitere Peptide synthetisiert und nach Vorschrift erst zyklisiert und anschließend in einer *CuAAC* mit dem wasserlöslichen THPTA umgesetzt.

Tabelle 3.4 **Übersicht der isolierten zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugate.** Die Tabelle zeigt die Peptid-Aminoglykosid-Konjugate mit der jeweiligen Sequenz, Ringgröße (Anzahl der Aminosäuren inklusive Cystein) und isolierter Ausbeute.

Nummer	Sequenz	Ringgröße	Ausbeute [%]
cP-A16	AcHN <u>C</u> [Pra-Nea]VY <u>C</u> CONH ₂	5	14.5
cP-A17	AcHN <u>C</u> Y[Pra-Neo]HK <u>C</u> CONH ₂	6	13.3
cP-A18	AcHN <u>C</u> [Pra-Nea]VY <u>C</u> CONH ₂	5	14.5
cP-A19	AcHN <u>C</u> SW[Pra-Nea]YP <u>C</u> CONH ₂	7	5.0

Die erhaltenen Ausbeuten der isolierten Peptide in Tabelle 3.4 zeigen bessere Ausbeuten in der CuAAC unter der Verwendung von THPTA als Ligand für Kupfer(I). Mittels Doppelprobe (**cP-A16** und **cP-A19**) konnte die Reproduzierbarkeit dieser Methode gezeigt werden.

An fester Phase wurden zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate vollständig aufgebaut, die eine hohe Diversität aufweisen. Die Zyklisierung erfolgte mit Hilfe eines bisfunktionalen Linkers. Diese Methode der Zyklisierung über Thioether ist in Lösung zwar bekannt und wurde hier erfolgreich an die feste Phase übertragen. Der strukturelle Aufbau dieser zyklischen Peptide ist variabel, da die Ringgröße, die Position des Alkins und die Positionen der Cysteine innerhalb einer Sequenz flexibel sind. Des Weiteren können durch den regioselektiven Diazotransfer auch andere Aminoglykoside an C3-Position azidiert werden. Es können so hoch diverse und strukturell vielfältige Peptid-Aminoglykosid-Konjugate aufgebaut werden. Vorteil des vollständigen Aufbaus an fester Phase ist, dass nur am Ende der Synthese ein Aufreinigungsschritt mittels semi-präparativer HPLC notwendig ist. Des Weiteren kann diese Methode vollständig automatisiert erfolgen.

Das Ziel geeignete Inhibitoren für die miRNA-Reifung zu finden, könnte mit zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugaten realisiert werden, indem die *one bead, one peptide* Methode angewendet wird. Diese Methode der *split-and-mix* Synthese beschreibt den Aufbau von randomisierten hoch divers Peptidbibliotheken.^[110a]

3.5 Modifikation von Peptiden mit Guanidinen als chemisches Werkzeug

Modifikationen von Aminofunktionen in Peptiden können die chemischen und biologischen Eigenschaften von Peptiden stark verändern. So erhöht die Einführung von Guanidingruppen die basischen Eigenschaften und erzeugt stabilisierte Kationen im Peptid. Des Weiteren werden durch Guanidingruppen Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen mit polaren und anionischen Molekülen und Resten in Peptiden und Proteinen erzeugt.^[146]

Der Einsatz von Argininen gestaltet sich in der Festphasensynthese oft als schwierig, da sie nur seitenkettengeschützt eingesetzt werden können. Die für die Guanidingruppe verwendete Schutzgruppe in der *SPPS* 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-Schutzgruppe (pbf-Schutzgruppe) bereitet präparativ ebenfalls oft Probleme, da es bei der Demaskierung der pbf-Gruppe zu Nebenreaktionen kommen kann.^[147] Die pbf-Gruppe kann in Arylcarbokation und Sulfonylrest abgebaut werden. In Folge dessen können Tryptophan und Arginin sulfoniert oder Tryptophan aryliert werden.

Die chemische Modifizierung von Aminen in Peptiden mit Guanidingruppen ist somit von Bedeutung. Die Gruppe um *Misicka* zeigte, dass die Guanidinylierung von Lysinen an fester Phase mittels Mikrowellenbestrahlung zwar möglich ist, aber mit mäßigen Ausbeuten und mit Nebenprodukten verläuft.^[148] Es wurde auch die Synthese von *N*^ω-Propylarginin an fester Phase ausgehend von Ornithin gezeigt, jedoch wurden recht harsche Bedingungen benötigt, um Reaktionsumsatz zu erhalten.^[149]

Als Guanidinylierungsmittel wurde *N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonyl-*N''*-triflylguanidin (*Goodman's Reagent*) verwendet, welches ausgehend von Guanidin Hydrochlorid synthetisiert wurde.^[117, 119]

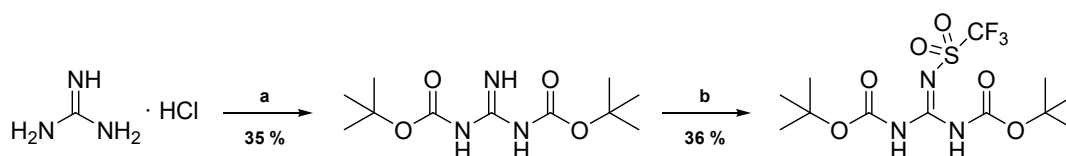


Abbildung 3.20 Darstellung der Syntheseroute von *N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonyl-*N''*-triflylguanidin ausgehend von Guanidin Hydrochlorid. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 2 äq. Boc_2O , 4 M NaOH, 1,4-Dioxan, 0 °C – RT, 2 d. b) 1 äq. Et_3N , 1 äq. Tf_2O , CH_2Cl_2 , -78 °C, 3.5 h.

Dazu wurde Guanidin Hydrochlorid zunächst in 1,4-Dioxan gelöst und unter Eiskühlung mit vier molarer Natriumhydroxidlösung versetzt. Im Anschluss wurde Di-*tert*-butyl-di-carbonat (Boc_2O) portionsweise hinzugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde aufgearbeitet und *N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonylguanidin in einer Ausbeute von 35 % als weißer Feststoff erhalten. Nachfolgend wurde *N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonylguanidin in trockenem Dichlormethan gelöst und Triethylamin hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf -78 °C gekühlt und langsam Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf_2O) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde aufgearbeitet und das *Goodman's Reagent* nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 36 % als weißer Feststoff erhalten.

Im Folgenden wurde die Testsequenz $\text{AcHN}^{\text{VKAG}}\text{CONH}_2$ gewählt, um geeignete Reaktionsbedingungen für die Guanidinylierung an fester Phase zu finden. Die Seitenkette des Lysins war mit einer selektiv demaskierbaren Schutzgruppe versehen. Dazu wurde die

Trifluoressigsäure-Schutzgruppe (tfa-Schutzgruppe) gewählt. Das Peptid wurde nach Vorschrift synthetisiert und eine Testspaltung zur Reaktionskontrolle vorgenommen. Die Schutzgruppe wurde mit wässriger Piperidinlösung demaskiert und anschließend mittels Testspaltung auf Reaktionsumsatz kontrolliert.

Das erhaltene Peptid wurde in Anlehnung an die Guanidinylierung von Aminoglykosiden in Lösung in verschiedenen Versuchsreihen an fester Phase guanidinyliert.^[127] Dazu wurden die Äquivalente an *Goodman's Reagent* und Base variiert. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Methanol und Wasser gewählt.

Tabelle 3.5 **Übersicht der verschiedenen Testreaktionen an fester Phase.** Es werden die verschiedenen Äquivalente an Triethylamin und *Goodman's Reagent* angegeben, die zum Zielpeptid führen sollen.

Nummer	Triethylamin [Äq.]	Goodman's Reagent [Äq.]
gP20	3	3
gP21	9	9
gP22	27	27

Die Peptide wurden mit dem jeweiligen Reaktionsgemisch für 24 Stunden bei Raumtemperatur behandelt und anschließend mittels Testspaltung auf Reaktionsumsatz überprüft.

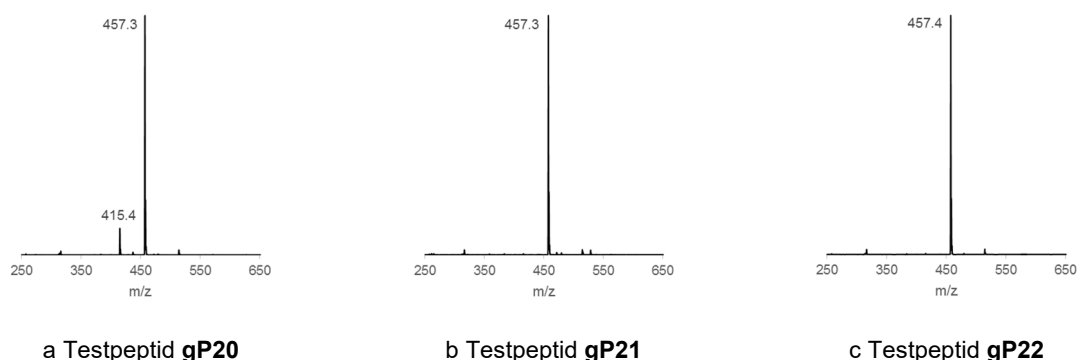


Abbildung 3.21 **Ausschnitte der erhaltenen Massenspektren der verschiedenen Testreaktionen.** Durch die Guanidinylierung von Lysin wird homo-Arginin (Har) dargestellt. Das Zielpeptid ($\text{AcNHV-Har-AG}^{\text{CONH}_2}$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 457.2$) wurde jeweils als Hauptprodukt erhalten. a Das Vorläuferpeptid ($\text{AcNHVKAG}^{\text{CONH}_2}$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 415.2$) ist noch zu erkennen.

Durch die Guanidinylierung von Lysin wird *homo*-Arginin (Har) dargestellt und es ergibt sich eine Masse von $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 457.2$ für das Zielpeptid $\text{AcNHV-Har-AG}^{\text{CONH}_2}$ **gP20-22**. Das Vorläuferpeptid $\text{AcNHVKAG}^{\text{CONH}_2}$ hat dabei eine Masse von $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 415.2$. Die erhaltenen Massenspektren zeigen, dass bei Verwendung von jeweils drei Äquivalenten des *Goodman's Reagent* und Triethylamin noch geringe Mengen an Eduktpeptid vorliegen (Abbildung 3.21a). Bereits neun Äquivalente an Base und Reagenz liefern vollständigen Reaktionsumsatz (Abbildung 3.21b).

Auf Grundlage dessen wurde die Sequenz um ein weiteres Lysin AcHNKAKGCONH_2 ($[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 444.2$) erweitert, nach Vorschrift synthetisiert, selektiv demaskiert und mit jeweils neun Äquivalenten an Base und *Goodman's Reagent* umgesetzt.

Das erhaltene Zielpeptid $\text{AcNHHar-A-Har-GCONH}_2$ **gP23** hat eine Masse von $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 528.3$ (Abbildung 3.22a). Der Ausschnitt des erhaltenen Massenspektrums zeigt, dass das Zielpeptid als Hauptprodukt gebildet wurde. Ebenso wurde ein Peptid **gP24** mit drei Lysinen $\text{AcNHHar-Har-Har-GCONH}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 627.4$) dargestellt. Wie der Ausschnitt des erhaltenen Massenspektrums in Abbildung 3.22b zeigt, wurde das Zielpeptid als Hauptprodukt gebildet.

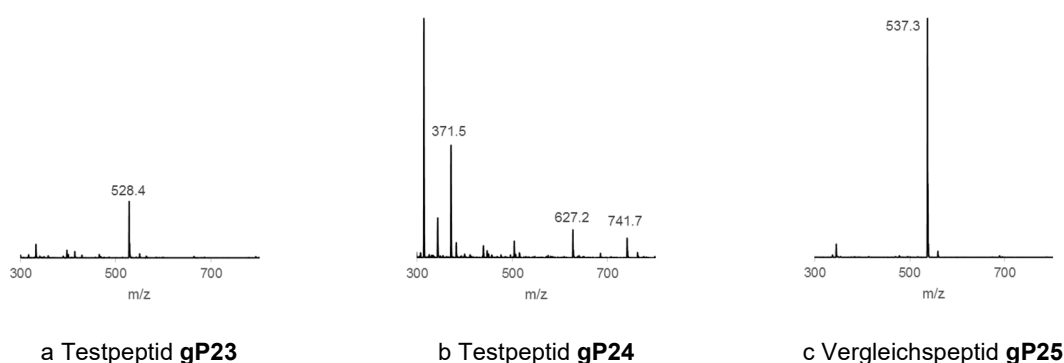


Abbildung 3.22 Ausschnitte der erhaltenen Massenspektren der verschiedenen Testpeptide **gP23**, **gP24** und Vergleichspeptid **gP25** nach Behandlung mit *Goodman's Reagent*. a Das Testpeptid $\text{AcNHHar-A-Har-GCONH}_2$ **gP23** ($[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 528.3$) liegt als Hauptprodukt vor. b Das Testpeptid $\text{AcNHHar-Har-Har-GCONH}_2$ **gP24** ($[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 627.4$) liegt als Hauptprodukt vor. Die anderen Signale entsprechen den TFA-Addukten und dem zweifach geladenen Hauptprodukt. c Das Vergleichspeptid **gP25** AcHNHar-PPLCONH_2 ($[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 537.3$) liegt ebenfalls als Hauptprodukt vor.

Die anderen Massen können den TFA-Addukten und dem zweifach geladenen Peptid zugeordnet werden. Um die Ergebnisse der Guanidinylierung an fester Phase mit den Ergebnissen von *Misicka et al.* zu vergleichen, wurde die gleiche Peptidsequenz AcHNKPPLCONH_2 synthetisiert und an fester Phase guanidinyliert. Das erhaltene Massenspektrum in Abbildung 3.22c zeigt nach der Testspaltung vollständigen Reaktionsumsatz zum Peptid **gP25** AcHNHar-PPLCONH_2 ($[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber}} = 537.3$). Zusätzlich wurden alle Testpeptide mit dem *Kaiser Test* auf freie Amine getestet.^[150] Alle Proben wiesen keine freien Amine auf.

3.6 Guanidinylierung von Triazolgebundenen Aminoglykosiden an fester Phase

Anhand dieser Ergebnisse sollte die Guanidinylierung an fester Phase an sterisch anspruchsvolleren Substraten durchgeführt werden. Dafür erwiesen sich die Aminoglykoside Neamin und Neomycin als geeignete Substrate. Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, werden durch Guanidinylierung die chemischen und biologischen Eigenschaften der Aminoglykoside

verändert. *Tor et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Guanidinylierung von Aminoglykosiden die Bindungsaffinität zur RNA erhöht.^[127]

Vorarbeiten in unserer Gruppe haben gezeigt, dass die *CuAAC* von Guanidinoneamin mit PNA-Oligomeren und Guanidinoneomycin mit Peptiden nicht erfolgreich war. Aus diesem Grund sollte ein Peptid-Guanidinoaminoglykosid-Konjugat systematisch an fester Phase synthetisiert werden.

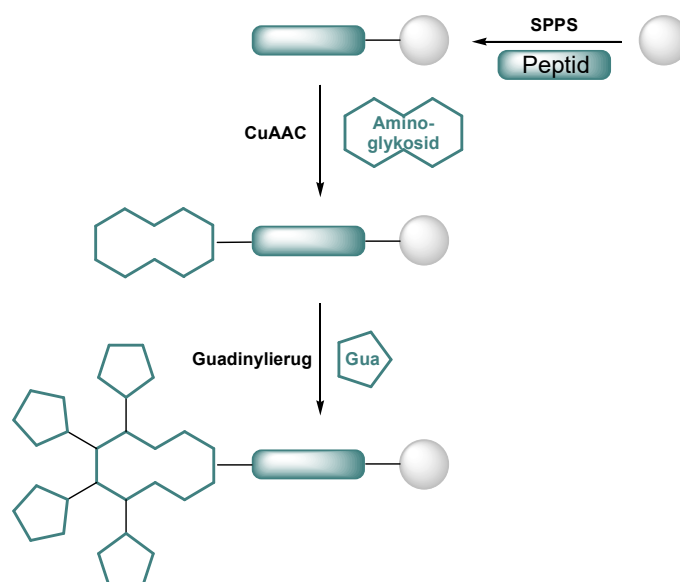


Abbildung 3.23 vereinfachte Darstellung des modularen Aufbaus von Peptid-Guanidinoaminoglykosid-Konjugaten an fester Phase.

Vorteil dieser Synthese ist, dass fast alle Reagenzien käuflich erhältlich sind und die Aufreinigung der einzelnen Reaktionsschritte durch die *Solid Phase Organic Synthesis* (SPOS) sehr einfach ist. Für Testreaktionen wurden zwei Peptide der Sequenz $\text{AcHN-Pra-LVA}^{\text{CONH}_2}$ verwendet. Diese Peptide wurden in einer *CuAAC* mit 3-Azido-Neomycin und -Neamin umgesetzt

Tabelle 3.6 Übersicht der beiden Testpeptide **P-gA26** und **P-gA27**. Es wird die Anzahl der freien Aminofunktionen und die jeweilige Zielsequenz gezeigt.

Nummer	Sequenz	Aminofunktionen	Zielsequenz
P-gA26	$\text{AcHN}[\text{Pra-Neo}]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$	5	$\text{AcHN}[\text{Pra-Neo}(\text{Gua})_5]\text{-LVA}^{\text{CONH}_2}$
P-gA27	$\text{AcHN}[\text{Pra-Nea}]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$	3	$\text{AcHN}[\text{Pra-Nea}(\text{Gua})_3]\text{-LVA}^{\text{CONH}_2}$

Im Folgenden sollten die freien Aminofunktionen des Neomycins und des Neamins guanidinyliert werden (Tabelle 3.6). Dazu wurde das Peptid-Aminoglykosid-Konjugat an fester Phase mit jeweils neun Äquivalenten *Goodman's Reagent* und Triethylamin in einem Methanol-Wasser-Gemisch für fünf Tage bei Raumtemperatur behandelt. Im Anschluss

wurden die Peptide nach Vorschrift vom Harz freigesetzt und mit Hilfe semi-präparativer HPLC aufgereinigt.

Die analytische Bestimmung der erhaltenen Fraktionen mittels UPLC-MS und MALDI-TOF zeigten, dass die vollständige Guanidinylierung des Neomycins an fester Phase möglich ist, jedoch nicht quantitativ verläuft. Das Zielprodukt konnte mit Hilfe der semi-präparativen HPLC von anderen Guanidinylierungsprodukten abgetrennt werden.

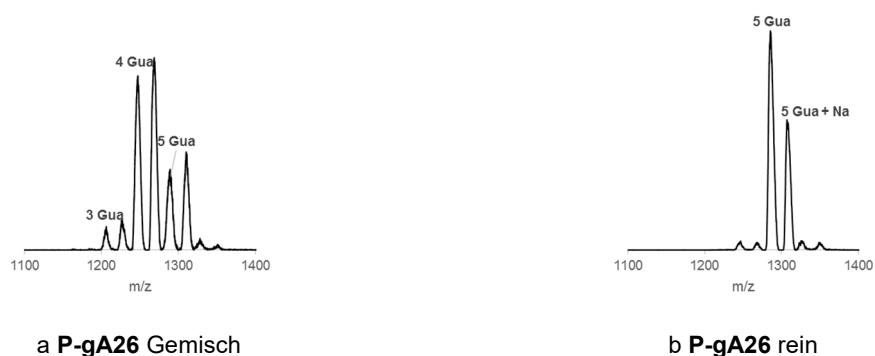


Abbildung 3.24 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der isolierten Fraktionen des Testpeptids P-gA26. a erhaltene Mischfraktion; b erhaltene reine Fraktion.

Das Spektrum der Abbildung 3.24a zeigt, dass ein Gemisch aus verschiedenen Konjugaten erhalten wurde. Das gemessene Hauptsignal zeigt das Peptid-Neomycin-Konjugat mit vier Guanidinfunktionen $^{AcHN}[Pra-Neo(Gua)_4]LVA^{CONH_2}$ und die zugehörigen Natriumaddukte. Ein Konjugat mit drei Guanidinfunktionen und das Zielprodukt **P-gA26** wurden ebenfalls detektiert. Die Abbildung 3.24b zeigt das isolierte Zielprodukt und das dazugehörige Natriumaddukt.

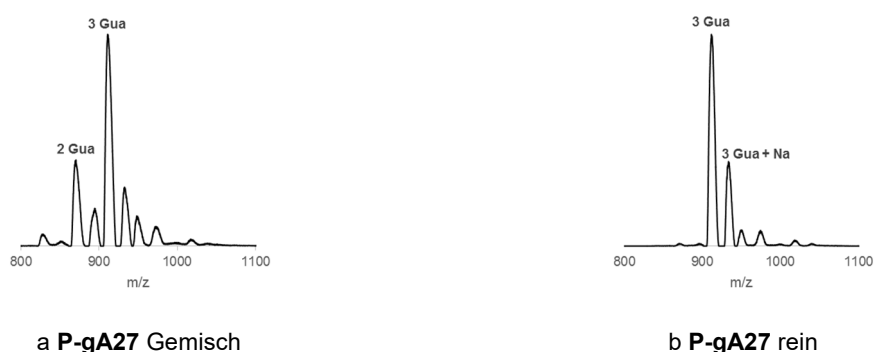


Abbildung 3.25 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der isolierten Fraktionen des Testpeptids P-gA27. a erhaltene Mischfraktion; b erhaltene reine Fraktion.

Wie die Abbildung 3.25b zeigt, konnte für das Peptid-Neamin-Konjugat ebenfalls das Zielpeptid $^{AcHN}[Pra-Nea(Gua)_3]LVA^{CONH_2}$ **P-gA27** mit drei Guanidinfunktionen isoliert werden.

Es wurde ebenfalls eine Mischfraktion aus $\text{AcHN}[\text{Pra-Nea}(\text{Gua})_2]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$ und $\text{AcHN}[\text{Pra-Nea}(\text{Gua})_3]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$ erhalten (Abbildung 3.25a).

Beide Reaktionen zeigen, dass es möglich ist sowohl Neamin als auch Neomycin an fester Phase zu guanidinylieren und diese von Nebenprodukten abzutrennen.

Da Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass die *CuAAC* von PNA und Guanidinoaminoglykosiden nur bedingt erfolgreich war, wurden die erhaltenen Ergebnisse auf PNA-Peptid-Aminoglykosid-Konjugate erweitert. Dazu wurden zwei Testsequenzen synthetisiert und an fester Phase mit 3-Azido-Neomycin umgesetzt.

Tabelle 3.7 Übersicht der beiden Testkonjugate **PPO-A28** und **PPO-A29**. Die Tabelle gibt die Sequenz und die jeweilige Position des Neomycins an.

Nummer	Sequenz	Position Neomycins
PPO-A28	$\text{AcHN}_{\text{agagGG}}[\text{Pra-Neo}]\text{G}^{\text{CONH}_2}$	C-Term
PPO-A29	$\text{AcHN}[\text{Pra-Neo}]\text{GGagag}^{\text{CONH}_2}$	N-Term

Die Guanidinylierung an fester Phase wurde in Gegenwart von PNA anhand beider Konjugate durchgeführt. Darüber hinaus wurde geprüft, ob die Position des Neomycins an C- oder N-Term einen Einfluss auf die Guanidinylierung hat. Nach Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC wurden zwar mehrere Fraktionen erhalten, jedoch konnte das Zielprodukt nicht detektiert werden. Es wurden lediglich Mischfraktionen erhalten.

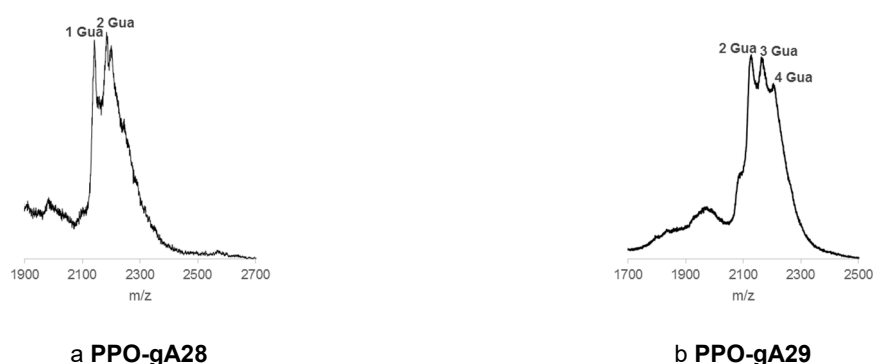


Abbildung 3.26 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren. a Konjugat PPO-gA28; b Konjugat PPO-gA29.

Die Ausschnitte der MALDI-TOF-Spektren der beiden Konjugate zeigen, dass unterschiedliche Gemische erhalten wurden. So zeigt die Abbildung 3.26a, dass für **PPO-gA28** ein Gemisch von Konjugaten mit einer und zwei Guanidinfunktionen erhalten wurde. Die Abbildung 3.26b zeigt für **PPO-gA29** ebenfalls ein Gemisch mehreren Konjugaten. Insgesamt verlief die Guanidinylierung an fester Phase mit Peptid-PNA-Neomycin-Konjugaten

deutlich schlechter. Die Guanidinylierung am *N*-Term zeigte im Vergleich bessere Ergebnisse. Ursache hierfür ist die mögliche Abschirmung des Neomycins durch die PNA-Oligomere. Nachfolgend wurde die Guanidinylierung an zyklischen Peptid-Neomycin-Konjugaten durchgeführt. Es wurden drei Peptide synthetisiert, zyklisiert, anschließend mittels *CuAAC* mit Neomycin umgesetzt und an fester Phase guanidinyliert.

Tabelle 3.8 Übersicht der gewählten Glykopeptide cP-A30-32.

Nummer	Sequenz
cP-A30	AcHN CY[Pra-Neo]PC ^{COHN2}
cP-A31	AcHN CHRIS[Pra-Neo]YC ^{COHN2}
cP-A32	AcHN C[Pra-Neo]YTSC ^{COHN2}

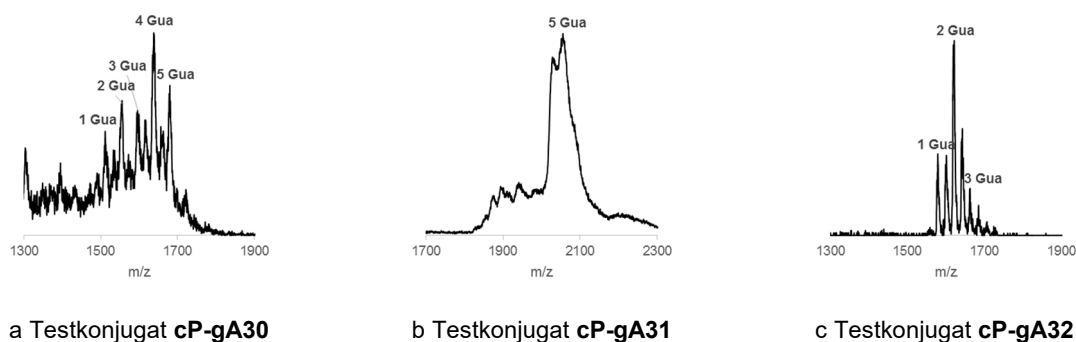


Abbildung 3.27 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der Testpeptide. a Testkonjugat **cP-gA30**; b Testkonjugat **cP-gA31**; c Testkonjugat **cP-gA32**.

Die Massenspektren zeigen, dass mehrere Produkte mit verschiedener Anzahl an Guanidinfunktionen erhalten wurden. Es wurde z. T. das vollguanidinylierte Neomycin-Konjugat gebildet, konnte jedoch nicht von anderen Konjugaten mit weniger Guanidinen abgetrennt werden. Wie in Abbildung 3.27b zu erkennen ist, zeigt die Analyse mittels MALDI-TOF das fünffach guanidinylierte Produkt als Hauptprodukt. Bei der Analyse mittels UPLC-MS konnte lediglich das drei- und vierfach guanidinylierte Peptid detektiert werden.

Insgesamt lassen sich die Peptide, auch wenn diese bereits funktionalisiert sind, an fester Phase guanidinylieren. Die Aufreinigung und die damit verbundene Trennung der erhaltenen Produkte ist problematisch. Durch geeignete chromatographische Methoden könnte eine Isolierung der Zielpeptide möglich sein.

3.6.1 Fluorophormarkierte Guanidinoneomycin-Konjugate

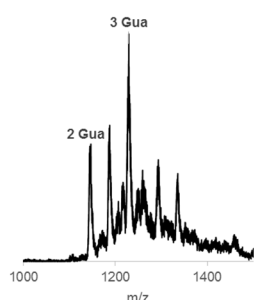
Für biologische Studien sind oft fluorophormarkierte Verbindungen nötig. Die verwendeten Konjugate wurden mit 5(6)-Carboxyfluorescein (FAM) versehen, da dieser Farbstoff über seine

Carbonsäurefunktion auf einfache Weise *N*-terminal an das Peptid oder Peptid-PNA-Konjugat geknüpft werden konnte.

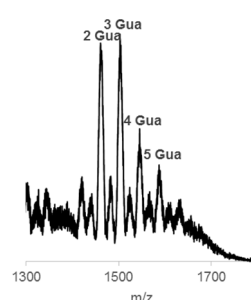
Das FAM-markierte Testpeptid $\text{FAMHN}[Pra-LVA]^{CONH_2}$ wurde synthetisiert und mit 3-Azido-Neomycin und -Neamin umgesetzt. Beide Konjugate wurden nach gleicher Vorschrift mit *Goodman's Reagent* und Triethyamin in einem Methanol-Wasser-Gemisch umgesetzt.

Tabelle 3.9 Übersicht der FAM-markierten Peptide-Aminoglykosid-Konjugate.

Nummer	Sequenz	Zielsequenz
P-gA33	$\text{FAMHN}[Pra-Nea]LVA^{CONH_2}$	$\text{FAMHN}[Pra-Nea(Gua)_3]LVA^{CONH_2}$
P-gA34	$\text{FAMHN}[Pra-Neo]LVA^{CONH_2}$	$\text{FAMHN}[Pra-Neo(Gua)_5]LVA^{CONH_2}$



a Testkonjugat **P-gA33**



b Testkonjugat **P-gA34**

Abbildung 3.28 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der Testpeptide. a Testkonjugat **P-gA33**; b Testkonjugat **P-gA34**.

Der Ausschnitt der MALDI-TOF-Spektren zeigt, dass das jeweilige Zielpeptid gebildet wurde, aber nicht isoliert werden konnte. Das Zielprodukt $\text{FAMHN}[Pra-Nea(Gua)_3]LVA^{CONH_2}$ **P-gA33** mit drei Guanidinfunktionen wurde als Hauptprodukt gebildet (Abbildung 3.28a). Als Nebenprodukt liegt das Peptid $\text{FAMHN}[Pra-Nea(Gua)_2]LVA^{CONH_2}$ mit zwei Guanidingruppen vor. Das Zielprodukt $\text{FAMHN}[Pra-Neo(Gua)_5]LVA^{CONH_2}$ **P-gA34** mit fünf Guanidinfunktionen wurde zwar gebildet, aber das entsprechende Derivat mit drei Guanidinen liegt hier als Hauptprodukt vor (Abbildung 3.28b). Konjugate mit zwei und vier Guanidinfunktionen wurden ebenfalls detektiert. Obwohl sich diese Konjugate von den vorher verwendeten Konjugaten **P-gA26** und **P-gA27** am *N*-Term nur durch das FAM unterschieden, waren die Reaktionsumsätze unterschiedlich.

Tabelle 3.10 Übersicht der verwendeten FAM-markierten Peptid-PNA-Konjugate.

Nummer	Sequenz	Position Neomycins
PPO-A35	$\text{FAMHN}[Pra-Neo]GGagag^{CONH_2}$	<i>N</i> -Term
PPO-A36	$\text{FAMHN}agagGG[Pra-Neo]G^{CONH_2}$	<i>C</i> -Term

Zum Vergleich wurden zwei Fam-markierte Testkonjugate mit Peptid-PNA-Rückgrat mit unterschiedlicher Position des Neomycins synthetisiert (Tabelle 3.10).

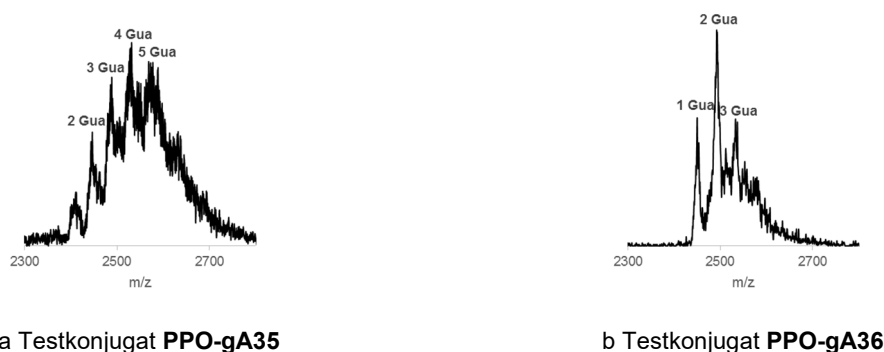


Abbildung 3.29 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der Testpeptide. a Testkonjugat **PPO-gA35**; b Testkonjugat **PPO-gA36**.

Beim *N*-terminalen Konjugat wurde als Hauptprodukt $\text{FAMHN}[\text{Pra-Neo}(\text{Gua})_4]\text{GGagag}^{\text{CONH}_2}$ mit vier Guanidineinheiten erhalten (Abbildung 3.29a). Das Zielprodukt $\text{FAMHN}[\text{Pra-Neo}(\text{Gua})_5]\text{GGagag}^{\text{CONH}_2}$ wurde zwar gebildet, stellt aber ein Nebenprodukt dar. Es wurden auch die Verbindungen mit zwei und drei Guanidinfunktionen erhalten. In Abbildung 3.29b ist das erhaltene Produktgemisch des *C*-terminalen Konjugats zu sehen. Als Hauptprodukt wurde ein Konjugat mit zwei Guanidinfunktionen gebildet. Das Zielprodukt wurde nicht detektiert. Die Guanidinylierung wurde im Folgenden an Konjugaten mit *C*- und *T*-Monomeren untersucht.

Tabelle 3.11 Übersicht der fluorophormarkierten Peptide-PNA-Konjugate mit *C*- und *T*-Monomeren.

Nummer	Sequenz	Neomycin	erhaltenes Hauptprodukt
PPO-A37	$\text{FAMHN}[\text{Pra-Neo}]\text{GGtcac}^{\text{CONH}_2}$	<i>N</i> -Term	$\text{FAMHN}[\text{Pra-Neo}(\text{Gua})_3]\text{GGtcac}^{\text{CONH}_2}$
PPO-A38	$\text{FAMHN}\text{tcacGG}[\text{Pra-Neo}]\text{G}^{\text{CONH}_2}$	<i>C</i> -Term	$\text{FAMHN}\text{tcacGG}[\text{Pra}-(\text{Neo})_3]\text{G}^{\text{CONH}_2}$

Die Veränderung der PNA-Monomere zeigt keinen besseren Reaktionsumsatz an fester Phase. Anhand dieser Ergebnisse ist festzustellen, dass eine Guanidinylierung von Neomycin an fester Phase *C*-terminal schlechter verläuft als *N*-terminal. Die Limitierung dieser Methode liegt zum einen an den sterisch gehinderten Aminofunktionen des Neomycins. Zum anderen stören Reste von Kupfer, die trotz Waschens im Harz zurückbleiben können. Kupfer wird durch die Guanidinfunktionen komplexiert.^[151] Dadurch stehen weniger Äquivalente des *Goodman's Reagent* für die Guanidinylierung an fester Phase zur Verfügung. Zur Optimierung der Reaktion ist es daher notwendig, das Harz nach der *CuAAC* gründlich mit wässriger Ammoniumchloridkösung zu waschen. Die Guanidinylierungsreaktion könnte auch durch Einsatz einer stärkeren Base oder Veränderung der Äquivalente erfolgen.

Um vollständig guanidinyliertes Neomycin an fester Phase zu erhalten, wurde die Reaktionsabfolge verändert. Dazu wurde 3-Azido-Neomycin in Lösung guanidinyliert anschließend in einer *CuAAC* an die feste Phase gebunden.

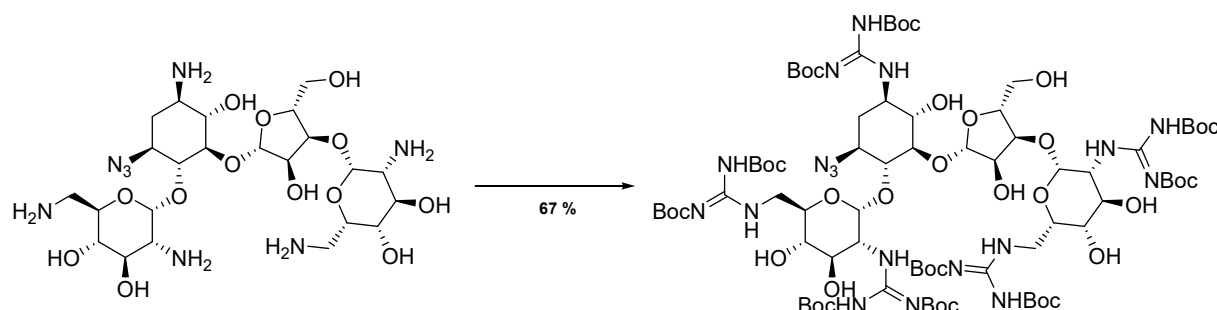


Abbildung 3.30 Darstellung von 3-Azido-boc-guanidinoneomycin ausgehend von 3-Azidoneomycin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 2 äq. *Goodman's Reagent*, 4 äq. Et_3N , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, RT, 5 d.

3-Azidoneomycin wurde mit *Goodman's Reagent* und Triethylamin in einem Methanol-Wasser-Gemisch umgesetzt. Es wurden 67 % 3-Azido-(1,2',6',2''',6'''-penta(di-*tert*-butyloxycarbonylguanidino))neomycin (3-Azido-boc-guanidinoneomycin) als weißer Feststoff nach säulenchromatischer Aufreinigung erhalten. Bei der Aufreinigung dieser Reaktion konnte nicht umgesetztes *Goodman's Reagent* reisoliert und nochmals verwendet werden.

Es wurden die verwendeten Testsequenzen erneut an fester Phase synthetisiert und anschließend mit 3-Azido-boc-guanidinoneomycin in einer *CuAAC* umgesetzt.

Tabelle 3.12 Übersicht der verwendeten fluorophormarkierten Konjugate für die *CuAAC* mit 3-Azido-boc-guanidinoneomycin an fester Phase. Die Eigenschaften dieser Konjugate sind angegeben.

Nummer	Sequenz	Bemerkung
P39	FAMHN-Pra-LVA ^{CONH2}	4 Aminosäuren
P40	FAMHN-Pra-CHRISSY ^{CONH2}	8 Aminosäuren
cP41	FAMHN-C-Pra-YTSC ^{CONH2}	6 Aminosäuren / zyklisch
PPO42	FAMHN-Pra-GGagag ^{CONH2}	PNA-Peptid / N-Term
PPO43	FAMHN-agagGG-Pra-G ^{CONH2}	PNA-Peptid / C-Term
PPO44	FAMHN-Pra-GGtcac ^{CONH2}	PNA-Peptid / N-Term
PPO45	FAMHN-tcacGG-Pra-G ^{CONH2}	PNA-Peptid / C-Term

Nach der *CuAAC* wurden die Sequenzen vom Harz freigesetzt und mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. In allen Produktfraktionen wurde ein zusätzliches Massensignal mit einer Massendifferenz von ~ 375 Masseneinheiten detektiert. Diese Massendifferenz wurde unabhängig von den Sequenzen erhalten.

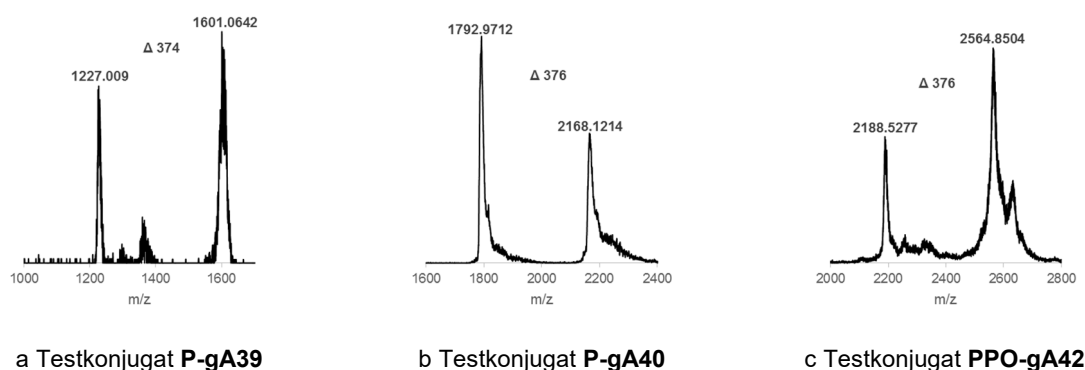


Abbildung 3.31 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der ausgewählten Testkonjugate. a Testkonjugat **P-gA39**; b Testkonjugat **P-gA40**; c Testkonjugat **PPO-gA42**.

Wie in den Abbildungen 3.31a-c zu sehen ist, konnten diese beiden Massen nicht voneinander getrennt werden. Da diese Massendifferenz offenbar sequenzunabhängig ist, erfolgte eine Reaktion am Gerüst des 3-Azido-boc-guanidinoneomycins.

In diesem Zusammenhang wurde 3-Azido-boc-guanidinoneomycin in Lösung mit vier molarer Salzsäure in 1,4-Dioxan umgesetzt, um die Guanidinfunktionen zu demaskieren. Die NMR- und Massen-Spektren nach dieser Reaktion zeigten, dass neben der Demaskierung der Boc-Gruppen auch das Neomycingerüst zum Neamingerüst abgebaut wurde.

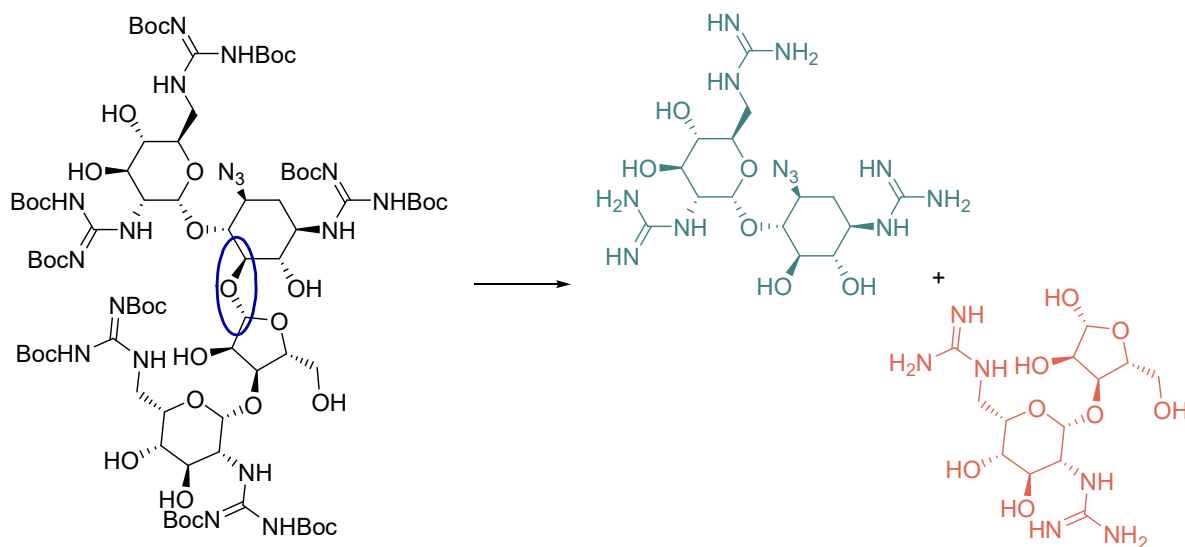


Abbildung 3.32 Spaltung der markierten glykosidischen Bindung (blau). Bei der Demaskierung der Guanidinfunktionen mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan wurden als Produkte 3-Azido-Neamin (blau) und das Spaltprodukt (rot) erhalten.

Die glykosidische Bindung wurde sauer katalysiert gespalten. Diese Reaktion erfolgt normalerweise in konzentrierter Salzsäure unter Rückfluss nach mehreren Tagen. Hier wurde diese Bindung bereits unter Eiskühlung mit einer vier molaren Salzsäure in 1,4-Dioxan nach

30 Minuten abgebaut. Die Massendifferenz zwischen 3-Azido-guanidinoneomycin und 3-Azido-guanidinoneamin beträgt Δ 376.1707 und entspricht damit der erhaltenen Massendifferenz.

Da die Neomycin-Konjugate sauer vom Harz freigesetzt wurden, erfolgte neben der Freisetzung und Demaskierung der Schutzgruppen, die Spaltung der glykosidischen Bindung im Neomycin. Neben den Neomycin-Konjugaten wurden so Neamin-Konjugate erhalten, die sich nur schwer voneinander trennen lassen. Um den Abbau zum Neamin während der Freisetzung vom Harz zu vermeiden, müsste die Freisetzung TFA-frei (säurefrei) erfolgen oder andere geeignete Polymere verwendet werden.

3.6.2 Guanidinylierte Neomycin-Peptid-Konjugate als potentielle CPPs

Die FAM-Markierung der Peptid-Guanidinoneomycin- Konjugate ermöglicht fluorophorbasierte Studien zur Zellpenetration durch FACS-Experimente. Dazu wurden die Peptide $\text{FAMHN}[\text{Pra-Nea}(\text{Gua})_3]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$ **P-gA33**, $\text{FAMHN}[\text{Pra-Neo}(\text{Gua})_{3-4}]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$ **P-gA34**, $\text{FAMHN}[\text{Pra-Neo/Nea}(\text{Gua})_{5/3}]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$ **P-gA39** und $\text{FAMHN}[\text{Pra-Nea}(\text{Gua})_3]\text{LVA}^{\text{CONH}_2}$ **P-gA39Nea** verwendet und für 24 Stunden mit Zellen der *MDA-MB-231*-Zelllinie inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Zellen im FACS-Experiment vermessen und ein Fluoreszenzintensitätsverteilungshistogramm erhalten. Bei diesem Histogramm wird die Fluoreszenzintensität (log10) gegen die Zellhäufigkeit für 10000 *MDA-MB-231*-Zellen aufgetragen.

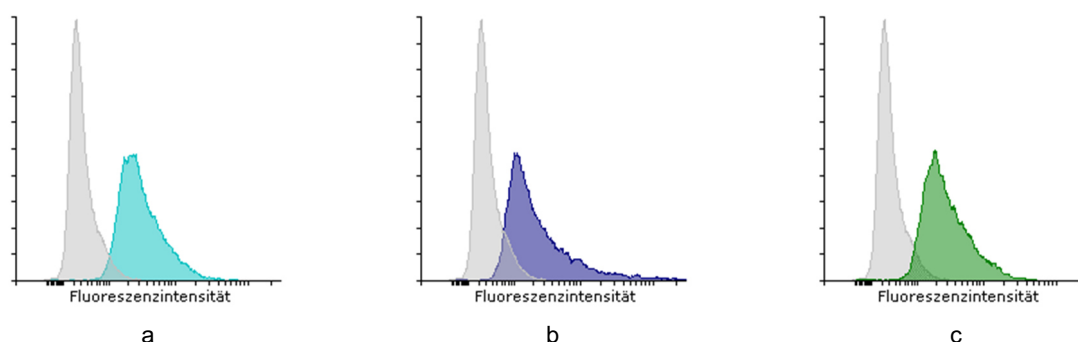


Abbildung 3.33 FACS-Histogramme der ausgewählten Peptid-Guanidinoaminoglykosid-Konjugate. Die Fluoreszenzintensität (FAM, log10) ist gegen die Zellhäufigkeit für 10000 *MDA-MB-231*-Zellen aufgetragen. Die nicht inkubierten *MDA-MB-231*-Zellen/Mock sind in grauer Farbe dargestellt; a Mock (grau) und Konjugat **P-gA33** (türkis); b Mock (grau) und Konjugat **P-gA34** (blau); c Mock (grau) und Konjugat **P-gA39 Nea**.

Die Histogramme in Abbildung 3.33 zeigen die einzelnen Konjugate verglichen mit der Grundfluoreszenz der *MDA-MB-231*-Zellen (Mock, grau). Für das Konjugat **P-gA39** konnte

kein Histogramm erhalten werden, da nur 150 Zellen gezählt wurden. Diese können somit nicht mit dem Mock verglichen werden.

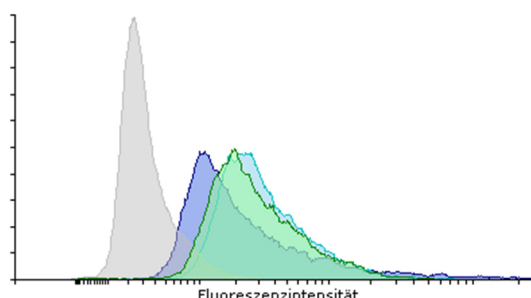


Abbildung 3.34 FACS-Histogramme aller gemessenen Peptid-Guanidinoaminoglykosid-Konjugate verglichen mit dem Mock.

Die Abbildung 3.34 zeigt die überlappten *FACS*-Histogramme aller gemessenen Peptid-Guanidinoneomycin-Konjugate. Es ist zu erkennen, dass alle inkubierten Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität zum Mock aufweisen. Dieses könnte darauf hindeuten, dass die Zellpenetration der Konjugate erfolgreich war. Präzisere Ergebnisse würde eine Konfokalmikroskopie liefern. In diesem Zusammenhang wurden keine weiteren Studien durchgeführt.

3.7 Effizientes Harz-Design für Peptidscreeningmethoden

Um Peptide in fluoreszenzbasierten Assays zu testen, ist es notwendig, diese mit Fluorophoren zu versehen. Auf diese Weise sollten Peptidsequenzen, die in unserer Gruppe mittels Phagen Display erhalten wurden, im Fluoreszenz-Polarisationsassay (FP-Assay) auf Bindung mit Zielprotein überprüft werden.

Standardmäßig erfolgt die Knüpfung von Farbstoff und Peptid entweder am freien *N*-Term des Peptids oder über freie Thiole im Molekül mit Maleimiden (Abbildung 3.35).^[152] Beide Methoden zur Verknüpfung mit einem Fluorophor scheiden aus, da zum einen der *N*-Term der Peptidsequenzen als freie Aminofunktion vorliegen soll und zum anderen Cysteine in den Peptidsequenzen enthalten sind.

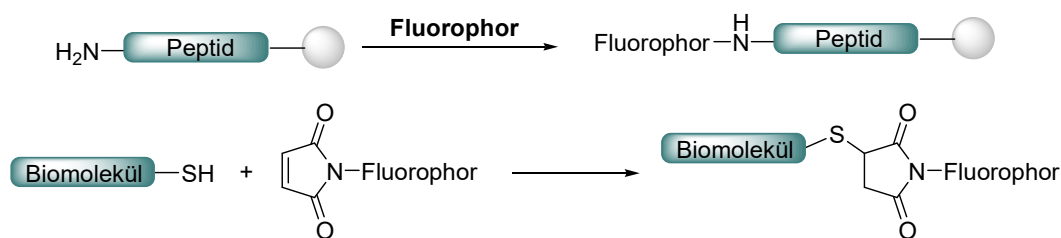


Abbildung 3.35 Vereinfachte Darstellung zur Markierung von Peptiden und Biomolekülen mit Fluorophoren.

Das kommerziell erhältliche Rink-Amid-Harz von *Novabiochem* wurde so funktionalisiert, dass dieses eine Knüpfungsstelle für Fluorophore wie FAM ohne besondere Schutzgruppenstrategien enthält. Eine geeignete Methode stellte die *CuACC* dar, bei der L-Propargylglycin als Alkin und FAM als Azid verwendet wurden.

Basierend auf dem Phagendesign des *Ph. D.-12TM-Kit* von *New England Biolabs* sind die Dodecapeptide durch „Spacer“ an den Phagen gebunden. Der Spacer enthält die Sequenz „GGGS“. Dementsprechend wurde das Harz funktionalisiert und als ^{Fmoc}HN-GGGS-Pra-G-Rink-Amid-PEG-Harz erhalten.

Um FAM als Azid darzustellen, wurde 2-(2-Aminoethoxy)ethoxyethanazid ausgehend von 1,2-Bis-2-Chloroethoxyethan synthetisiert. Dazu wurde dieses mit *N,N*-Dimethylformamid verdünnt und mit 3.3 Äquivalenten Natriumazid und [18]-Krone-6 versetzt.

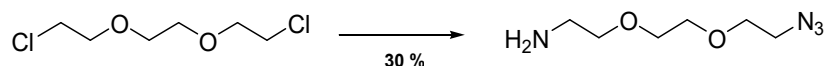


Abbildung 3.36 Darstellung von 2-(2-Aminoethoxy)ethoxyethanazid. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 3.3 äq. NaN_3 , Spatelspitze [18]-Krone-6, *N,N*-Dimethylformamid, 60 °C, 2 d; 0.97 äq. PPh_3 , RT, 7 h.

Das erhaltene Bisazid wurde ohne weitere Charakterisierung in einer *Staudinger-Reduktion* mit Triphenylphosphan zu [2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanazid reduziert und als gelbes Öl in einer Ausbeute von 30 % erhalten.^[153]

Nachfolgend wurde FAM in einem Tetrahydrofuran-*N,N*-Dimethylformamid-Gemisch gelöst und mit Diisopropylcarbodiimid und *N*-Hydroxysuccimid versetzt.

Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt und im Anschluss daran wurde 2-(2-Aminoethoxy)ethoxyethanazid verdünnt in einem Boratpuffer-*N,N*-Dimethylformamid-Gemisch hinzugetropft.

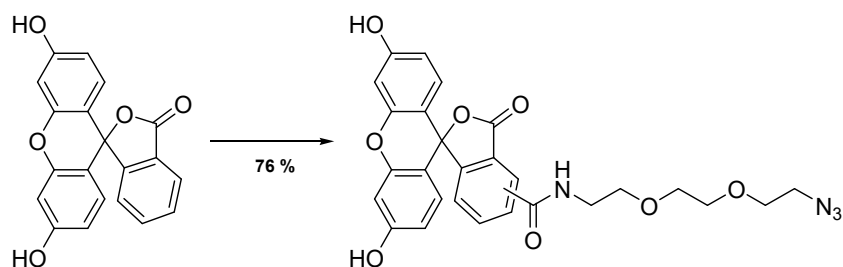


Abbildung 3.37 Darstellung von N-([2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanazid)-5(6)-Fluoresceinamid.
 Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 1.2 äq. Diisopropylcarbodiimid, 1.2 *N*-Hydroxysuccimid, Tetrahydrofuran, *N,N*-Dimethylformamid, RT, über Nacht; 0.66 äq. 2-(2-Aminoethoxy)ethoxyethanazid, Boratpuffer pH 8.5, *N,N*-Dimethylformamid, RT, 24 h.

Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde nach Vorschrift aufgearbeitet und *N*-(2-(2-aminoethoxy)ethoxyethanazid)-5(6)-Fluoresceinamid (FAM-Azid) in einer Ausbeute von 73 % erhalten.

Das funktionalisierte Harz wurde für eine automatisierte *SPPS* zur Synthese, der Peptide verwendet und anschließend in einer *CuAAC* mit TBTA, Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, Natriumascorbat und FAM-Azid umgesetzt. Vor der Freisetzung vom Harz wurde die *N*-terminale Fmoc-Gruppe demaskiert und die Peptide mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Durch den Einsatz des funktionalisierten Harzes, der automatisierten *SPPS* und der *CuAAC* können auf einfache Weise Screeningmethoden, wie z. B. ein Alanin-Scan durchgeführt werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die festphasenbasierte Synthese von potentiellen Inhibitoren für die miRNA-Reifung aus leicht zugänglichen Reagenzien. Dazu wurden im ersten Teilprojekt dieser Arbeit zehn zyklische Peptidderivate erfolgreich an fester Phase synthetisiert und isoliert. Die erhaltenen zyklischen Peptidderivate variieren in Länge, Wahl der Aminosäuren und enthalten zum Teil die modifizierte Aminosäure Propargylglycin.

Die Derivatisierung ausgehend von Glycin zu Fmoc-Propargylglycin erfolgte zum einen mittels der enantioselektiven Alkylierung nach Corey in einer Gesamtausbeute von 44 % über drei Stufen.^[135-136] Im Vergleich dazu wurde eine zweite Synthese in Anlehnung der Syntheseroute nach *Granja* durchgeführt.^[138] Die Alkylierung eines Malonesters erfolgte zunächst ohne Enantioselektivität. Dieser alkylierte Malonester wurde mittels Verseifung und Decarboxylierung zu *N*-Acetylpropargylglycin abgebaut. Die Darstellung von L-Propargylglycin erfolgte mittels einer enzymatischen Reaktion mit der *Acylase I Aspergillus melleus*. Fmoc-Propargylglycin wurde so in einer Gesamtausbeute von 7 % über vier Stufen erhalten. Verglichen mit der Synthese nach Corey ist die erhaltene Ausbeute zwar schlechter, jedoch erfolgt die Darstellung von Fmoc-Propargylglycin zum großen Teil in wässrigen Lösungen und in einfachen Reaktionsschritten. Bei einer Optimierung der Ausbeuten, wäre diese Route aufgrund der leichten Durchführbarkeit zu bevorzugen.

Die Zyklisierung der Peptide erfolgte in Anlehnung an die bekannte Zyklisierung durch Thioetherbildung in Lösung und konnte erfolgreich an fester Phase angewendet werden. Dazu wurde in den Seitenketten zweier Cysteine mit dem bisfunktionalen Linker *N,N'*-Di-chloracetyl-2,6-diaminopyridin zyklisiert. In Hinsicht auf eine potentielle inhibitorische Wirkung kann der Heteroaromat des Linkers zusätzlich die Affinität zur RNA erhöhen.

Aufgrund der erfolgreichen Synthese der zyklischen Peptidderivate wurden vollständig an fester Phase zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate mit einer Maximalausbeute von 14.5 % synthetisiert und isoliert. Die Zyklisierung erfolgte ausgehend von einem linearen Vorläuferpeptid und wurde gefolgt von einer *CuAAC* an fester Phase mit den derivatisierten Aminoglykosiden Neamin und Neomycin. Diese wurden in einem regioselektiven

Diazotransfer an der C3-Position des 2-DOS-Gerüsts in einer Ausbeute von bis zu 91 % erhalten.^[140]

Auf diese Weise wurden neun zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate vollständig an fester Phase über *CuAAC* aus leichtzugänglichen Reagenzien dargestellt. Diese zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugate variieren ebenfalls in ihrer Länge und Zusammensetzung der Aminosäuren.

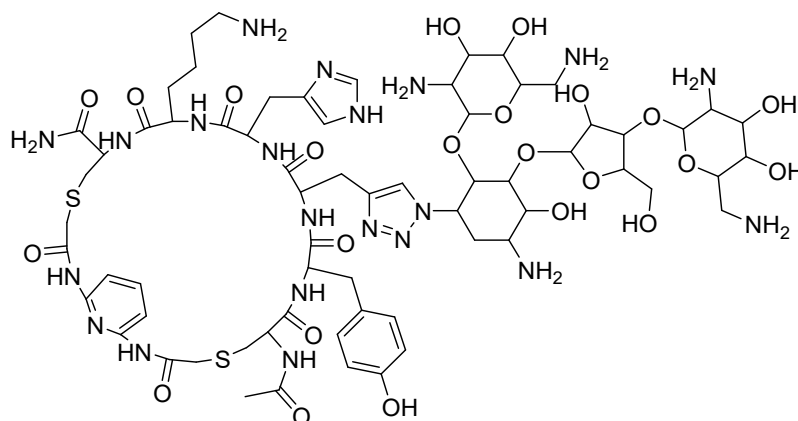


Abbildung 4.1 Darstellung des zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugats cP-A17.

Mit dieser Synthese können zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate in hoher Diversität dargestellt werden, da diese in der Ringgröße (Anzahl der Aminosäuren), Variabilität der Aminosäuren, Position der Alkylgruppe und die Aminoglykoside nicht nur auf Neamin und Neomycin begrenzt sind. Durch den pH-Wert gesteuerten regioselektiven Diazotransfer können auch andere Aminoglykoside, wie z. B. Amikacin, Apramycin und Ribostamycin azidiert werden.

Aufbauend auf diesen Parametern ist es möglich, eine festphasenbasierte, strukturell diverse Substanzbibliothek aufzubauen und dadurch geeignete Inhibitoren der miRNA zu identifizieren.

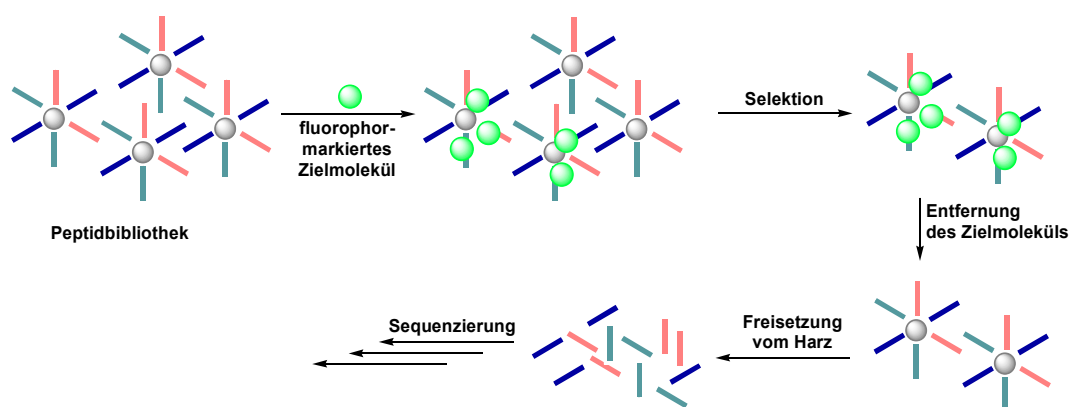


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung einer Selektion mittels einer *one bead, one peptide* Bibliothek.

Um potentielle Inhibitoren zu identifizieren, könnte die Zyklisierung an fester Phase in *one bead, one peptide* Bibliotheken angewendet werden (Abbildung 4.2).^[110a] Mit dieser Methode lassen sich so randomisierte, zyklische Peptid-Aminoglykosid-Konjugate einfach aufbauen. In der *split-and-mix* Synthese wird eine Aminosäuresequenz pro Harzkugel erhalten. Die Selektion erfolgt, indem die Harzkugeln mit dem fluorophormarkiertem Zielmolekül behandelt werden. Nach Assoziation erfolgt die Isolierung der Harzkugeln. Die Peptide werden vom Harz freigesetzt und mittels MS-Methoden sequenziert.

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit sollte die Guanidinylierung an fester Phase gezeigt werden. Die Guanidinylierung an fester Phase ist zwar bekannt, bedingt aber harsche Reaktionsbedingungen und liefert mäßige Ausbeuten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Guanidinylierung an fester Phase mittels *Goodman's Reagent* unter milden Reaktionsbedingungen gezeigt. Dazu wurden zunächst einfache Testpeptide mit verschiedener Anzahl an Lysinen synthetisiert und in der Seitenkette zu *homo*-Arginin guanidinyliert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit UPLC-MS und dem *Kaiser Test*. Die Guanidinylierung verlief bei diesen Testpeptiden quantitativ. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurden sterisch anspruchsvollere Substrate für die Guanidinylierung gewählt. Dazu wurden zwei Testpeptide an fester Phase in einer *CuAAC* mit 3-Azido-Neamin und 3-Azido-Neomycin umgesetzt. An den Aminofunktionen beider Aminoglykoside wurde die Guanidinylierung durchgeführt. Die Kontrolle mittels UPLC-MS ergab, dass die gewünschten Produkte gebildet wurden, jedoch verlief die Reaktion nicht quantitativ. Durch Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC konnten die Zielverbindungen isoliert werden. Im Folgenden wurden verschiedene Peptid- und Peptid-PNA-Rückgrate gewählt, um Neomycin in Abhängigkeit dieser an fester Phase zu guanidinylieren. Die gewünschten Zielprodukte wurden meist gebildet, jedoch wurden nach Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC Produktgemische erhalten. Grund hierfür könnten Rückstände von Kupfer aus der *CuAAC* sein, die im verwendeten Harz zurückbleiben können. Das *Goodman's Reagent* und Kupfer könnten unter diesen Umständen Komplexe bilden. Um dieses Problem zu umgehen, sollte mit z. B. Ammoniumchloridlösung gewaschen werden, um die Kupferreste zu entfernen. Des Weiteren bedarf es einer Optimierung der Guanidinylierungsreaktion an fester Phase, indem die Anzahl der Äquivalente an *Goodman's Reagent* und Base verändert wird. Die Base könnte auch gegen eine stärkere Base getauscht werden.

Nach Optimierung der Guanidinylierung könnten so auch sterisch anspruchsvolle Substrate an fester Phase guanidinyliert werden. Es lassen sich so Moleküle aufbauen, die in Hinsicht auf eine miRNA-Reifung Potential als Inhibitor haben und gleichzeitig zellpermeabel sind.

Im dritten Teilprojekt wurde erfolgreich ein fluorophorbasierter Spacer entwickelt, der ohne aufwendige Schutzgruppenstrategie in verschiedenen Screeningmethoden, wie dem Alanin-Scan eingesetzt werden kann. Durch die Derivatisierung von 5(6)-Carboxyfluorescein in FAM-Azid wurde gezeigt, dass auf diese Weise auch andere Fluorophore, wie z. B. Rhodamin B in ein Azidderivate überführt werden können. Dadurch können verschiedene Wellenlängenbereiche abgedeckt werden. Des Weiteren ist diese Methode des Fluorophormarkierens nicht nur auf die manuelle *SPPS* begrenzt, sondern kann auch vollständig automatisiert erfolgen.

Gemäß der Idee von Merrifield Strukturen modular an fester Phase aufzubauen, lassen sich mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Methoden, hoch komplexe und diverse Substanzbibliotheken an fester Phase aufbauen. Die dargestellten Reaktionen könnten zukünftig zum Aufbau von *one bead, one peptide* Bibliotheken verwendet werden, um so potentielle Inhibitoren für die *Dicer*-vermittelte miRNA-Reifung zu identifizieren.

5 Experimenteller Teil

5.1 Methoden und Materialien

5.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in höchster Qualität und ohne weitere Aufreinigung von *ABCR* (Karlsruhe, Deutschland), *Acros* (Geel, Belgien), *Bachem* (Bubendorf, Schweiz), *Fluka* (Taufkirchen, Deutschland), *Link Technologies Ltd.* (Lanarkshire, Großbritannien), *Novabiochem* (Darmstadt, Deutschland), *Sigma-Aldrich* (St. Louis, USA), *TCI-International* (Tokyo, Japan) und *VWR International* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die für die Peptidsynthese verwendeten Lösungsmittel *N,N*-Dimethylformamid und Trifluoressigsäure (TFA) besaßen den Reinheitsgrad "PEPTIDE SYNTHESIS". Die für UPLC-MS und Semi-präparative HPLC Experimente verwendeten Lösungsmittel Acetonitril, Ameisensäure (FA), Methanol und Trifluoressigsäure besaßen die Reinheitsgrade "gradient grade" (Acetonitril, Semi-präparative HPLC), "LC-MS grade" (Acetonitril und Methanol, UPLC-MS), "for mass spectrometry" (FA, UPLC-MS) und "PEPTIDE SYNTHESIS" (TFA, UPLC-MS, semi-präparative HPLC). Für UPLC-MS Experimente wurde zum einen Wasser im Reinheitsgrad "LC-MS grade" und zum anderen "Millipore" verwendet. Für wässrige Lösungen und hergestellten Puffer wurde Wasser des Reinheitsgrads "Millipore" verwendet. Die Aufreinigung des Wassers erfolgte durch eine *Astacus Life Science* Millipore-Anlage der Firma *membraPure* (Bodenheim, Deutschland). Die zusätzlich verwendeten Lösungsmittel Cyclohexan, Dichlormethan, Essigsäureethylester und Methanol wurden zur Aufreinigung destilliert. Die unter Argon verwendeten Lösungsmittel wurden entweder dem *solvent purification system SPS 800* von *MBraun* (Garching, Deutschland) entnommen (Dichlormethan, *N,N*-Dimethylformamid, Tetrahydrofuran), über aktivierten Molsieb (3 Å) gelagert (Triethylamin) oder kommerziell erworben (Acetonitril, 1,4-Dioxan).

5.1.2 Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie

Die Kontrolle des Reaktionsumsatzes erfolgte mit Hilfe von Dünnschichtchromatographieplatten (Aluminium, TLC Silica gel 60, F254) von Merck (Darmstadt, Deutschland). Zur Detektion dienten ultravioletten (UV) Licht der Wellenlängen $\lambda = 254$ und 366 nm. Es wurden des Weiteren die Anfärbereagenzien Ninhydrin (1 g Ninhydrin, 125 g Ethanol) und Vanillin-Schwefelsäure (8.6 g Vanillin, 2.5 mL Schwefelsäure und 200 mL Ethanol) verwendet. Säulenchromatographische Aufreinigungen wurden mit Kieselgel 60M von Macherey & Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt.

5.1.3 NMR-Spektroskopie

Die Aufzeichnung der ^1H - und ^{13}C -APT-NMR-Spektren erfolgte an einem *Avance-II-500 Bruker Biospin Spektrometer* (Rheinstetten, Deutschland). Die chemischen Verschiebungen δ sind in parts per million (ppm) angegeben und auf die charakteristischen Restsignale der verwendeten deuterierten Lösungsmittel geeicht: ^1H (CDCl_3) = 7.26 ppm, ^{13}C (CDCl_3) = 77.0 ppm, ^1H (CD_3OD) = 3.31 ppm, ^{13}C (CD_3OD) = 49.05 ppm, ^1H (DMSO-d_6) = 2.50 ppm und ^{13}C (DMSO-d_6) = 39.43 ppm. Die Signalmultiplizitäten wurden folgend abgekürzt: brs (breites Singulett), s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quadruplett) und m (Multiplett). Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) aufgeführt. Die Messungen wurden von *Frau Angela Thiesies* und *Frau Katharina Pfaff* ausgeführt.

5.1.4 ESI-HRMS

Die hochaufgelösten Massenspektren (HRMS) wurden mit Elektrosprayionisation (ESI) mit einem LTQ FT UltraTM Spektrometer von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) aufgezeichnet. Die Messungen wurden von Frau Angelika Woyda durchgeführt.

5.1.5 UPLC-MS

Die analytischen UPLC-MS-Experimente für Testspaltungen wurden mit einer 1290 Infinity Series von Agilent (Santa Clara, USA) mit einem Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt. Die Detektion erfolgte in nanometer (nm) mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 225 nm. Als stationäre Phase diente eine Zorbax C18 (SB) RR HD Säule (2.1 x 50 mm, 1.8 μm) von Agilent. Als mobile Phase wurden Puffer A 99.9 % Wasser und 0.1 % FA und Puffer B 99.9 % Acetonitril und 0.1 % FA. Es wurden verschiedene Gradienten verwendet: 3 % B in Puffer A bis 30 B % in 3 min (0.4 mL/min), 3 % B in Puffer A bis 40 % B in 2.5 (0.8 mL/min,

4 und 5 min (0.4 mL/min), 3 % B in Puffer A bis 60 % B in in 2 (0.6 mL/min) und 6 min (0.4 mL/min). Es wurde ein weiterer Gradient verwendet: 5 % Methanol in Puffer A bis 90 % Methanol in 2 min (0.4 mL/min) Die UPLC-MS-Experimente der finalen Peptide wurden mit einem Acquity System von Waters (Milford, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 210 nm. Als stationäre Phase diente eine BEH130 C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm). Die Säule wurde auf 50 °C temperiert. Als mobile Phase dienten Puffer A 98.9 % Wasser, 1 % Acetonitril, 0.1 % TFA und Puffer B 98.9 % Acetonitril, 1 % Wasser, 0.1 % TFA. Es wurden verschiedene Gradienten verwendet: 3 % B in Puffer A bis 40 % B in 2.5 min, 3 % B in Puffer A bis 60 % in 2.5 min und 3 % B in Puffer A bis 80 % B in 4 min. Die Flussrate betrug 0.5 mL/min.

Für die Analytik der Testspaltungen wurden die erhaltenen Reaktionsgemische verdünnt injiziert. Dadurch werden im UV-Chromatogramm mehrere Signale neben dem Produktsignal erhalten.

5.1.6 Semi-präparative HPLC

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte mit einer Semi-präparativen HPLC 1100 Series von Agilent. Als Trennsäule diente hierbei eine Polaris C18 A (10 x 250 mm, 5µm) von Varian (Palo Alto, USA). Als mobile Phase diente Puffer A 98.9 % Wasser, 1 % Acetonitril, 0.1 % TFA und Puffer B 98.9 % Acetonitril, 1 % Wasser, 0.1 % TFA. Es wurden folgende Gradienten verwendet: 3 % B in Puffer A bis 40 % in 30 min (6 und 15 mL/min), 3 % B in Puffer A bis 60 % in 30 min (15 mL/min) und 3 % B in Puffer A bis 70 % in 30 min (6 mL/min).

5.1.7 UV-VIS-Spektroskopie

Alle Absorptionsmessungen wurden mit Hilfe eines *Nanodrop-Spektrometer ND-1000* von *Peqlab Biotechnologie* (Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die jeweiligen Konzentrationen wurden nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Dabei beträgt $d = 0.1$ cm. Es wurden zu den verwendeten Wellenlängen die spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ε verwendet.

5.1.8 MALDI-TOF

Die Massenspektren wurden an einem *Axima Confidence* MALDI-MS von *Shimadzu Europa GmbH* (Duisburg, Deutschland) mit einem Time of Flight Spektrometer (TOF) im positiven Modus gemessen. Für diese Messungen wurden verschiedene Matrices verwendet: 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 mg/mL in Wasser), Sinapinsäure (10 mg/mL in 2:1; v:v, Acetonitril : 0.1 % TFA in Wasser), α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (10 mg/mL in 1:1; v:v, Acetonitril : 0.1 % TFA in Wasser).

Zum Teil wurden Spektren mit einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis erhalten. Dieses lag zum einen an Kristallisationsproblemen und die verwendeten Matrices entsprachen zum Teil nicht dem MS-Standard.

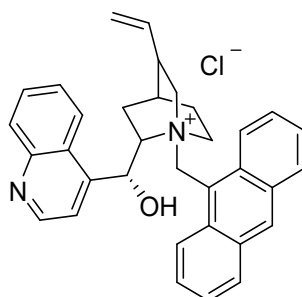
5.1.9 Zusätzlich verwendete Geräte

Die verwendeten Spritzenreaktoren wurden von *Intavis Bioanalytical Instruments AG* (Köln, Deutschland) bezogen. Zum Schütteln der Spritzenreaktoren wurde ein *Kombischüttler KL2* von der Firma *Edmund Bühler GmbH* (Hechingen, Deutschland) verwendet. Die Abtrennung von präzipitierten Peptiden erfolgte in der *Megafuge 1.0R* von *Heraeus* (Newport Pagnell, England) für 5 min bei 3500 rpm bei Raumtemperatur.

Für die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde ein *MultiPep RS* Synthesizer von *Intavis Bioanalytical Instruments AG* (Köln, Deutschland) verwendet.

5.2 Synthese der Reagenzien

5.2.1 N-9-Anthracylmethylcinchonidiniumchlorid

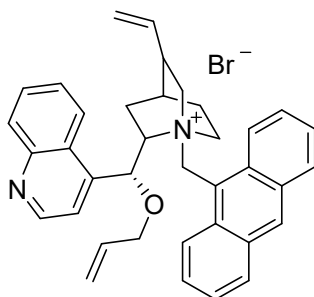


Unter Argon wurden zunächst 10 mL Tetrahydrofuran vorgelegt und 1 g (3.4 mmol, 1 äq.) Cinchonidin hinzugegeben. Anschließend wurden 0.79 g (3.5 mmol, 1.03 äq.) 9-Chlormethylantracen addiert. Die gelbliche Suspension wurde unter Rückfluss 5 h erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden zum Reaktionsgemisch 10 mL Diethylether hinzugefügt und die

Lösung abfiltriert. Der Rückstand wurde mit Diethylether nachgespült, in Dichlormethan gelöst und anschließend das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt.

0.95 g (1.83 mmol, 62 %) gelber Feststoff | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 9.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.86 (d, $J = 4.4$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.76 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.21 (d, $J = 4.2$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.05 (d, $J = 4.2$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.01 (s, 1 H, C_{arH}), 7.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, C_{arH}), 7.64 – 7.66 (m, 1 H, C_{arH}), 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, C_{arH}), 7.43 – 7.41 (m, 1 H, C_{arH}), 7.28 – 7.27 (m, 1 H, C_{arH}), 7.25 – 7.21 (m, 3 H, C_{arH}), 7.11 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H, C_{arH}), 7.06 – 7.05 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.74 (dd, $J = 13.8, 35.3$ Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.42 (ddd, $J = 6.1, 10.6, 16.9$ Hz, 1 H, CHOH), 5.23 (dd, $J = 1.0, 17.3$ Hz, 1 H, CH_2), 4.90 (dd, $J = 1.4, 10.6$ Hz, 1 H, CH_2), 4.78 – 4.68 (m, 1 H, CH_2), 4.00 (d, $J = 13.1$ Hz, 1 H, CH), 2.58 (dd, $J = 10.7, 12.9$ Hz, 1 H, CH), 2.45 (dt, $J = 1.5, 11.8$ Hz, 1 H, CH_2), 2.14 – 2.13 (m, 1 H, OH), 1.88 – 1.80 (m, 2 H, CH_2), 1.70 (d, $J = 0.7$ Hz, 2 H, CH_2), 1.14 (dd, $J = 18.2, 19.1$ Hz, 1 H, CH_2), 1.02 (ddd, $J = 3.5, 6.4, 11.9$ Hz, 1 H, CH_2). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 136.3 (C_{arH}), 132.7 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 131.2 (C_{arH}), 130.4 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 128.6 (C_{arH}), 128.4 (C_{arH}), 127.7 (C_{arH}), 127.4 (C_{arH}), 125.9 (C_{arH}), 125.7 (C_{arH}), 124.8 (C_{arH}), 123.9 (C_{arH}), 120.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 118.2 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 117.7 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 117.5 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 61.2 (CH_2), 55.1 (CH_2), 50.7 (CH_2), 38.4 (CH), 25.8 (CH), 25.6 (CH_2), 23.2 (CH_2). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}]^+$ 485.2587, gef. 485.2588.

5.2.2 O-(9)-Allyl-N-(9)-anthracylmethylcinchonidinumbromid

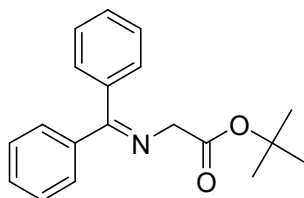


0.95 g (1.38 mmol, 1 äq.) *N*-9-Anthracylmethylcinchonidinumchlorid wurden in 7 mL Dichlormethan suspendiert. Zunächst 0.37 mL Allylbromid hinzugeben und anschließend 0.37 mL 50 %ige Kaliumhydroxidlösung in Wasser. Es wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 15 mL Wasser erfolgte eine Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen. Es wurde langsam mit Diethylether

überschichtet und über Nacht auskristallisiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderten Druck abfiltriert und das Produkt getrocknet.

0.56 g (1.08 mmol, 79 %) orange gelber Feststoff | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 9.77 (s, 1 H, C_{arH}), 9.04 (d, $J = 3.8$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.63 (s, 1 H, C_{arH}), 8.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.18 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, C_{arH}), 8.12 – 8.11 (m, 1 H, C_{arH}), 8.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, C_{arH}), 7.85 – 7.80 (m, 2 H, C_{arH}), 7.61 – 4.49 (m, 4 H, C_{arH}), 7.18 (s, 1 H, C_{arH}), 6.68 (s, 1 H, C_{arH}), 6.30 (ddd, $J = 5.3, 10.5, 16.6$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.92 (ddd, $J = 7.1, 10.3, 17.3$ Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.61 – 5.53 (m, 3 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.18 (dd, $J = 0.8, 17.1$ Hz, 1 H, CH_2), 5.05 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H, CH_2), 4.53 – 4.45 (m, 2 H, CH_2), 4.36 (tdd, $J = 1.5, 4.3, 13.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.98 (s, 1 H, CH), 2.69 (t, $J = 10.9$ Hz, 1 H, CH), 2.35 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, CH_2), 2.20 (s, 1 H, CH_2), 1.99 (tdd, $J = 3.8, 11.0, 15.0$ Hz, 1 H, CH_2), 1.90 (s, 1 H, CH_2), 1.78 (s, 2 H, CH_2), 1.51 (s, 1 H, CH_2), 1.42 (m, 1 H, CH_2). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 148.8 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 136.7 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 134.2 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 133.4 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 132.8 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 132.3 ($\text{C}_{\text{ar-H}}$), 131.6 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 131.0 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 128.9 (C_{arH}), 128.8 (C_{arH}), 127.7 (C_{arH}), 127.2 (C_{arH}), 126.0 (C_{arH}), 124.9 (C_{arH}), 123.5 (C_{arH}), 118.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 118.3 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 61.3 (CH_2), 51.0 (CH_2), 38.7 (CH), 26.5 (CH), 25.9 (CH_2), 23.6 (CH_2). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}]^+$ 525.2900, gef. 525.2901.

5.2.3 *N*-Benzophenon-glycin-imin-*tert*-butylester

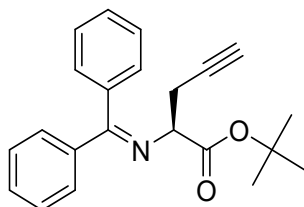


Unter Argon wurden 2.5 g (14.95 mmol, 1 äq.) Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid vorgelegt und anschließend mit 6.21 mL (44.85 mmol, 3 äq.) Triethylamin und 12.5 mL Acetonitril suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss erhitzt. Nach Bildung einer klaren Lösung wurden über 30 min 2.87 mL (14.95 mmol, 1 äq.) α,α -Dichlordiphenylmethan verdünnt in 12.5 mL Acetonitril hinzugegeben. Es wurde für weitere 3.5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der orangen Lösung wurde das Reaktionsgemisch unter verminderten Druck filtriert und die erhaltene klare Lösung unter verminderten Druck eingedampft.

2.76 g (9.38 mmol, 62 %) leicht gelber Feststoff | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 7.64 – 7.63 (m, 2 H, C_{arH}), 7.45 – 7.42 (m, 3 H, C_{arH}), 7.36 – 7.34 (m, 1 H, C_{arH}), 7.31 – 7.28 (m, 2 H, C_{arH}), 7.16 – 7.14 (m, 2 H, C_{arH}), 4.10 (s, 2 H, CH_2), 1.44 (s, 9 H, CH_3). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 171.3 (C_{qOO}), 169.7 ($\text{C}_{\text{q=N}}$), 139.2 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 136.0

(C_{q,ar}), 130.2 (C_{arH}), 128.6 (C_{arH}), 128.5 (C_{arH}), 127.9 (C_{arH}), 127.5 (C_{arH}), 80.9 (C_q), 56.2 (CH₂), 28.0 (CH₃). | ESI-HRMS *m/z* für [C₁₉H₂₂NO₂]⁺ 296.1645, gef. 296.1646.

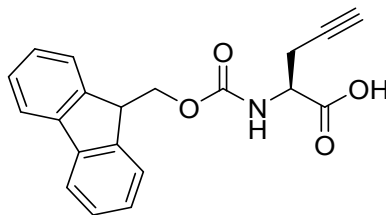
5.2.4 (S)-N-Benzophenon-propargylglycin-imin-*tert*-butylester



In einem Schlenkkolben wurden unter Argon 500 mg (1.69 mmol, 1 äq.) *N*-Benzophenon-glycin-imin-*tert*-butylester zusammen mit 89.1 mg (0.17 mmol, 10 mol%) *O*-(9)-Allyl-*N*-(9)-anthracylmethylcinchonidiniumbromid und 2.49 g (14.87 mmol, 8.8 äq.) Cäsiumhydroxid Monohydrat vorgelegt und in 19 mL Dichlormethan suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf – 78 °C gekühlt. Es wurden 941 µL Propargylbromid (8.45 mmol, 80 %ig in Toluol, 5 äq.) langsam über 30 min hinzuge tropft, sodass die Temperatur konstant blieb. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei – 78 °C gerührt. Nachfolgend wurde mit 60 ml Dieethylether verdünnt und zweimal mit 20 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (25:1 Cyclohexan : Essigsäureethylester) aufgereinigt.

472 mg (1.42 mmol, 84 %) gelbes Öl | *R*_f = 0.67 (20 % Essigsäureethylester in Cyclohexan) | ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ [ppm] = 7.66 – 7.64 (m, 2 H, C_{arH}), 7.46 – 7.38 (m, 4 H, C_{arH}), 7.35 – 7.32 (m, 2 H, C_{arH}), 7.26 (dd, *J* = 2.4, 7.2 Hz, 2 H, C_{arH}), 4.17 (dd, *J* = 5.16, 8.13 Hz, 1 H, CH), 2.84 – 2.63 (m, 2 H, CH₂), 1.95 (t, *J* = 2.65 Hz, 1 H, ≡CH), 1.45 (s, 9 H, CH₃). | ¹³C-APT-NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ [ppm] = 171.4 (C_qOO), 169.5 (N=C_q), 139.6 (C_{q,ar}), 136.2 (C_{q,ar}), 130.3 (C_{arH}), 128.9 (C_{arH}), 128.6 (C_{arH}), 128.3 (C_{arH}), 128.2 (C_{arH}), 127.9 (C_{arH}), 81.6 (C_q≡CH), 81.2 (C_q), 70.0 (C_q≡CH), 64.7 (CH), 27.9 (CH₃), 23.3 (CH₂). | ESI-HRMS *m/z* für [C₂₂H₂₄NO₂]⁺ 334.1802, gef. 334.1803.

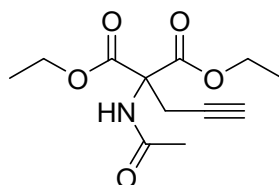
5.2.5 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin



Es wurden 382 mg (1.14 mmol, 1 äq.) (S)-*N*-Benzophenon-propargylglycin-imin-*tert*-butylester in 25 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 8.6 mL 6 M Salzsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt und bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 23 mL Wasser aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die wässrige Phase wurde zweimal 50 mL Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 239 mg (2.85 mmol, 2.5 äq.) Natriumhydrogencarbonat versetzt und unter Eiskühlung zu 384 mg (1.14 mmol, 1 äq.) 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimidester gelöst in 23 mL Tetrahydrofuran hinzugegeben. Es wurde für 2 d bei Raumtemperatur gerührt, nachfolgend bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 50 mL Diethylether extrahiert. und anschließend mit 50 mL Essigsäureethylester überschichtet und durch Zugabe von 1 M Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH 1 gebracht. Die wässrige Phase wurde noch dreimal mit 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten Essigsäureethylesterphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (100 % Essigsäureethylester → 3 % Methanol, 0.1 % Ameisensäure in Essigsäureethylester).

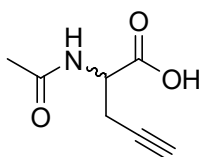
325 mg (0.97 mmol, 85 %) weißer Feststoff | R_f = 0.21 (100 % Essigsäureethylester) | $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ [ppm] = 7.80 (d, J = 7.5 Hz, 2 H, C_{arH}), 7.68 (dd, J = 1.5, 7.4 Hz, 2 H, C_{arH}), 7.35 (td, J = 7.4, 39.4 Hz, 4 H, C_{arH}), 4.38 – 4.31 (m, 3 H, $-\text{CH}_2$, CH-COOH), 4.25 (t, J = 7.1 Hz, 1 H, CH), 2.91 – 2.53 (m, 2 H, CH_2), 2.37 (t, J = 2.6 Hz, 1 H, $\equiv\text{CH}$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CD_3OD , 126 MHz) δ [ppm] = 173.8 (C_qOOH), 158.4 (OC_qONH), 145.3 ($\text{C}_\text{q,ar}$), 142.6 ($\text{C}_\text{q,ar}$), 128.8 (C_{arH}), 128.2 (C_{arH}), 126.4 (C_{arH}), 121.0 (C_{arH}), 80.3 ($\text{C}_\text{q}\equiv\text{CH}$), 72.1 (CH_2), 68.2 ($\text{C}_\text{q}\equiv\text{CH}$), 54.3 (CH-COOH), 48.4 (CH), 22.7 (CH_2). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{NO}_4]^-$ 334.1085, gef. 334.1084.

5.2.6 Diethyl-2-acetamido-2-propynylmalonat



Unter Argon wurden 3 g (13.81 mmol, 1 äq.) Diethyl-2-acetamidomalonat in 90 mL 1,4-Dioxan gelöst und anschließend 1.55 g (13.81 mmol, 1 äq.) Kalium-*tert*-butanolat hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2.5 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurden 1.54 mL (13.8 mmol, 80%ig in Toluol, 1 äq.) Propargylbromid hinzugetropft. Es wurde für weitere 11 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand mit Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingeeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (10 % Essigsäureethylester in Cyclohexan → 40 % Essigsäureethylester in Cyclohexan) aufgereinigt.

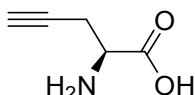
2.69 g (10.5 mmol, 76 %) weißer Feststoff | R_f = 0.35 (40 % Essigsäureethylester in Cyclohexan) | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ = 6.93 (brs, 1 H, NH), 4.27 – 4.24 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.27 (d, J = 2.6 Hz, 2 H, CH_2), 2.06 (s, 3 H, CH_3), 1.96 (t, J = 2.3 Hz, 1 H, $\equiv\text{CH}$), 1.26 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 169.3 ($\text{C}_\text{q}\text{OO}$), 166.7 ($\text{C}_\text{q}\text{ONH}$), 78.3 ($\text{C}_\text{q}\equiv\text{CH}$), 71.4 ($\equiv\text{CH}$), 63.0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 23.8 (CH_2), 22.9 (CH_3), 13.9 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_3$). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_5]^+$ 256.1180, gef. 256.1180.

5.2.7 *N*-Acetylpropargylglycin

2.69 g (10.5 mmol, 1 äq.) Diethyl-2-acetamido-2-propynylmalonat wurden in 80 mL 2 M Kaliumhydroxidlösung versetzt und etwas Ethanol addiert. Das Reaktionsgemisch wurde 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 50 mL Wasser aufgenommen. Es wurde mit 6 M Salzsäure auf pH 5 gebracht und anschließend für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite und Aktivkohle filtriert und das erhaltene Filtrat mit 2 M Salzsäure auf pH 3 eingestellt. Die wässrige Lösung wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt.

596 mg (3.84 mmol, 36 %) weißer Feststoff | $R_f = 0.82$ (30 % Dichlormethan in Methanol und Ameisensäure) | $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) $\delta = 4.54$ (dd, $J = 5.3, 7.1$ Hz, 1 H, CH), 2.76 – 2.65 (m, 2 H, CH_2), 2.36 (t, $J = 2.69$ Hz, 1 H, $\equiv\text{CH}$), 2.01 (s, 3H, CH_3). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CD_3OD , 126 MHz) δ [ppm] = 173.4 (C_qOOH), 173.3 (C_qONH), 80.2 ($\text{C}_q\equiv\text{CH}$), 72.1 ($\text{C}_q\equiv\text{CH}$), 52.7 (CH), 22.4 (CH_2), 22.4 (CH_3). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_3]$. 154.0510, gef. 154.0509.

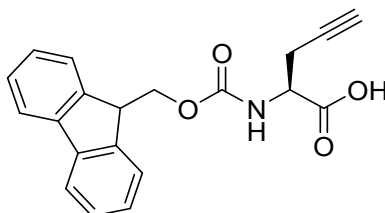
5.2.8 L-Propargylglycin



596 mg (3.84 mmol, 1 äq.) N-Acetylpropargylglycin wurden in 65 mL eines Phosphatpuffers (0.2 M, pH 7.5) gelöst und 63.7 mg Acylase I *Aspergillus melleus* hinzugegeben. Es wurde eine Spatelspitze Cobalt-(II)-Chlorid addiert und bei 37 °C gerührt. Nach 2 d wurde die eingetrübte Lösung mit 1 M Salzsäure auf pH 5 eingestellt und über Aktivkohle filtriert. Im Anschluss wurde auf pH 1 gestellt und mit viermal 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die wässrige Phase wurde auf 4 ml aufkonzentriert und über eine Ionenaustauschersäule mit Dowex®50W X8 aufgereinigt. Der Ionenaustauscher wurde beladen und mit Millipore gespült bis das Eluat pH 7 aufwies. Anschließend wurde mit 10 %iger Ammoniumhydroxid Lösung das Propargylglycin eluiert.

128 mg (1.13 mmol, 30 %) weißer Feststoff | $R_f = 0.50$ (30 % Dichlormethan in Methanol und Ameisensäure) | $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz) $\delta = 3.79$ (t, $J = 5.3$ Hz, 1 H, CH), 2.74 – 2.73 (m, 2 H, CH_2), 2.40 (t, $J = 2.7$ Hz, 1 H, $\equiv\text{CH}$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (D_2O , 126 MHz) δ [ppm] = 172.8 (C_qOOH), 77.7 ($\text{C}_q\equiv\text{CH}$), 73.4 ($\text{C}_q\equiv\text{CH}$), 52.9 (CH), 20.5 (CH_2). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_2]^+$ 114.0550, gef. 114.0549.

5.2.9 N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin

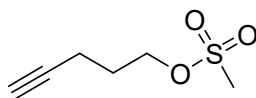


128 mg (1.13 mmol, 1 äq.) L-Propargylglycin wurden in 20 mL Wasser gelöst und 273 mg (3.25 mmol, 2.5 äq.) Natriumhydrogencarbonat hinzugegeben. Diese wässrige Lösung wurde langsam unter Eiskühlung zu 381 mg (1.13 mmol, 1 äq.) 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-N-

hydroxysuccinimidester gelöst in 20 mL Tetrahydrofuran hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit zweimal 50 mL Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 50 mL Essigsäureethylester überschichtet und durch Zugabe 1 M Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde nochmals dreimal mit 50 mL Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (100 % Essigsäureethylester → 3 % Methanol, 0.1 % Ameisensäure in Essigsäureethylester).

325 mg (0.97 mmol, 85 %) weißer Feststoff | $R_f = 0.16$ (100 % Essigsäureethylester) | $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) $\delta = 7.79$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H, C_{arH}), 7.67 (dd, $J = 2.0, 7.4$ Hz, 2 H, C_{arH}), 7.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, C_{arH}), 7.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, C_{arH}), 4.36 – 4.33 (m, 3 H, CH_2 , CH-COOH), 4.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 1 H, CH), 2.79 – 2.66 (m, 2 H, CH_2), 2.37 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, $\equiv\text{CH}$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CD_3OD , 126 MHz) δ [ppm] = 173.7 (C_{qOOH}), 158.4 (OC_{qONH}), 145.3 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 142.6 ($\text{C}_{\text{q,ar}}$), 128.8 (C_{arH}), 128.2 (C_{arH}), 126.4 (C_{arH}), 121.0 (C_{arH}), 80.3 ($\text{C}_{\text{q}\equiv\text{CH}}$), 72.1 (CH_2), 68.2 ($\text{C}_{\text{q}\equiv\text{CH}}$), 48.4 (CH-COOH , CH), 22.7 (CH_2). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{NO}_4]^-$ 334.1085, gef. 334.1084.

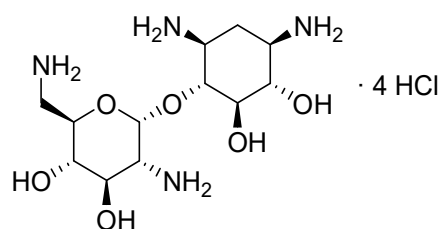
5.2.10 Pent-4-inylmethansulfonat



Unter Argon wurden 1.5 g (17.8 mmol, 1 äq.) Pent-4-in-1-ol in 13.5 mL Dichlormethan gelöst und anschließend 24.7 mL (178.3 mmol, 10 äq.) Triethylamin hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf -78°C gekühlt und anschließend wurden über 60 min 1.73 mL (22.3 mmol, 1.25 äq.) Methansulfonylchlorid verdünnt in 6 mL Dichlormethan langsam hinzugetropft. Es wurde im Anschluss für weitere 60 min bei -78°C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde auf 150 mL Eiswasser gegossen und die entstandenen Phasen sofort getrennt. Die organische Phase wurde zweimal mit 50 mL Wasser extrahiert, zweimal mit 30 mL 1 M Salzsäure gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (100 % Cyclohexan → 40 % Essigsäureethylester in Cyclohexan) aufgereinigt.

2.39 g (14.8 mmol, 83 %) leicht gelbes Öl | $R_f = 0.69$ (100 % Dichlormethan) | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 4.34 (t, $J = 6.1$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.02 (s, 3 H, CH_3), 2.35 (dt, $J = 2.7$, 6.8 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-C}_q\equiv\text{CH}$), 2.00 (t, $J = 2.7$ Hz, 3 H, $\equiv\text{CH}$), 1.95 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 82.0 ($\text{C}_q\equiv\text{CH}$), 69.8 ($\text{C}_q\equiv\text{CH}$), 68.2 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 37.2 (CH_3), 27.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 14.6 ($\text{CH}_2\text{-C}_q\equiv\text{CH}$). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NaO}_3\text{S}]^+$ 185.0243, gef. 185.0243.

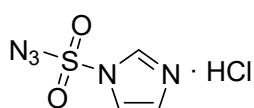
5.2.11 Neamin Tetrahydrochlorid



25 g (27.5 mmol, 1 äq.) Neomycin B sulfat wurden in 62.5 mL Methanol gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden 18.8 mL konzentrierte Salzsäure hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 22 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Volumen unter verminderten Druck auf ein Drittel eingeeengt und anschließend unter verminderten Druck das Lösungsmittel abfiltriert. Insgesamt wurde dieser Schritt zweimal wiederholt.

6.29 g (13.4 mmol, 49 %) lachsfarbener Feststoff | $R_f = 0.32$ (25 % Ammoniumhydroxid-Lösung in Methanol) | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 5.85 (d, $J = 3.9$ Hz, 1 H, $1'\text{CH}$), 3.94 – 3.89 (m, 3 H, $5'\text{CH}$, 4-CH , $3'\text{CH}$), 3.62 (t, $J = 9.2$ Hz, 1 H, $4'\text{CH}$), 3.52 (t, $J = 8.0$ Hz, 1 H, 3CH), 3.49 – 3.46 (m, 1 H, 5CH), 3.41 (t, $J = 6.2$ Hz, 1 H, 6CH), 3.39 – 3.36 (m, 2 H, $6'\text{CH}_2$), 3.30 – 3.26 (m, 1 H, $2'\text{CH}$), 3.20 (dd, $J = 7.0$, 13.6 Hz, 1 H, 1CH), 2.43 (td, $J = 4.2$, 12.5 Hz, 1 H, 2_{ax}CH), 1.84 (q, $J = 12.6$ Hz, 1 H, $2_{\text{äq}}\text{CH}$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (D_2O , 126 MHz) δ [ppm] = 95.9 ($1'\text{CH}$), 77.5 ($5'\text{CH}$), 75.2 (4CH), 72.5 (5CH), 70.7 (6CH), 69.2 ($2'\text{CH}$), 68.2 ($3'\text{CH}$), 53.5 ($4'\text{CH}$), 48.9 (1CH), 48.4 (3CH), 40.1 ($6'\text{CH}_2$), 28.2 (2CH_2). | ESI-MS m/z für $[\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6]^+$ 323.2, gef. 323.3.

5.2.12 Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid

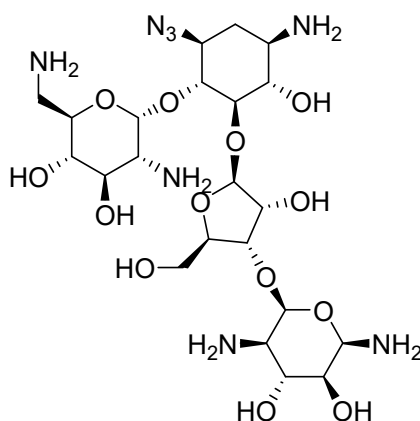


Unter Eiskühlung wurden 6.5 g (100 mmol, 1 äq.) Natriumazid in Acetonitril suspendiert und langsam 8.1 mL (100 mmol, 1 äq.) Sulfonylchlorid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde

über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde unter Eiskühlung 13 g (190 mmol, 1.9 äq.) Imidazol portionsweise hinzugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 200 mL Essigsäureethylester verdünnt und die organische Phase mit zweimal 200 mL Wasser und anschließend mit zweimal 200 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Durch Zutropfen *in situ* hergestellter Salzsäure in Ethanol (Dazu wurden 11 mL Acetylchlorid langsam unter Eiskühlung in trockenem Ethanol hinzutropft.) wurde das Produkt ausgefällt und getrocknet.

11.8 g (56.3 mmol, 56 %) weißer Feststoff | $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz) δ [ppm] = 9.32 (m, 1 H, N- $\text{C}_{\text{ar}}\text{H-N}$), 7.94 (m, 1 H, N- $\text{C}_{\text{ar}}\text{H-C}$), 7.52 (m, 1 H, C- $\text{C}_{\text{ar}}\text{H-N}$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (D_2O , 126 MHz) δ [ppm] = 137.7 (N- $\text{C}_{\text{ar}}\text{H-N}$), 123.5 (N- $\text{C}_{\text{ar}}\text{H-C}$), 120.0 (C- $\text{C}_{\text{ar}}\text{H-N}$). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_5\text{O}_2\text{S}]^+$ 174.0080, gef. 174.0080.

5.2.13 3-Azido-Neomycin

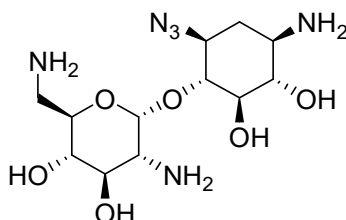


1.5 g (1.65 mmol, 1 äq.) Neomycin B sulfat wurden in 75 mL Wasser gelöst. Anschließend wurden 2.7 g (13.2 mmol, 8 äq.) Imidazolsufurylazid Hydrochlorid in 75 mL Wasser gelöst und diese Lösung wurde zur wässrigen Neomycin B sulfat Lösung gegeben. Es wurde mit 2 M Natriumhydroxidlösung der pH 6.6 eingestellt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (2:1:1, v:v:v, Chloroform : Methanol : 17 %ige ammoniakalische Lösung; obere Phase). Das Lösungsmittel der vereinigten Fraktionen wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde bis zur trockne eingengt.

971 mg (1.51 mmol, 91 %) gelbliches Öl | R_f = 0.52 (2:1:1, Chloroform : Methanol : 17 %ige ammoniakalische Lösung; obere Phase) | $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz) δ [ppm] = 5.70 (d,

$J = 3.9$ Hz, 1 H, 1'CH), 5.35 (dd, $J = 2.9, 11.3$ Hz, 1 H, 1''CH), 5.30 (d, $J = 1.9$ Hz, 1 H, 1'''CH), 5.23 (d, $J = 1.7$ Hz, 1 H, CH), 4.45 (dd, $J = 4.7, 6.9$ Hz, 1 H, 3''CH), 4.40 (ddd, $J = 2.2, 4.7, 10.8$ Hz, 1 H, 2''CH), 4.28 – 4.26 (m, 1 H, CH), 4.20 – 4.15 (m, 4 H, CH₂, CH, CH, CH), 3.87 – 3.74 (m, 7 H, CH), 3.72 – 3.58 (m, 6 H, CH, CH₂), 3.53 (m, 2 H, CH), 3.42 – 3.31 (m, 8 H, CH), 3.29 – 3.16 (m, 4 H, CH, CH₂), 2.42 (td, $J = 4.1, 12.6$ Hz, 1 H, 2_{ax}CH), 1.70 (dd, $J = 12.4, 24.3$ Hz, 1 H, 2_{äq}CH). | ¹³C-APT-NMR (D₂O, 126 MHz) δ [ppm] = 110.8 (1''CH), 95.3 (1'''CH), 95.1 (1'CH), 85.6 (5CH), 81.1 (CH), 77.0 (CH), 75.0 (CH), 73.3 (CH), 72.4 (CH), 70.5 (CH), 70.3 (CH), 69.2 (CH), 69.0 (CH), 68.7 (CH), 67.7 (CH), 67.2 (4'''CH), 60.5 (5''CH₂), 58.8 (CH), 53.9 (CH), 50.8 (CH), 49.9 (CH), 40.4 (6'''CH₂), 40.2 (6'CH₂), 29.5 (2CH₂). | ESI-HRMS m/z für [C₂₃H₄₅N₈O₁₃]⁺ 641.3101, gef. 641.3108.

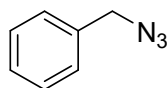
5.2.14 3-Azido-Neamin



1.5 g (3.2 mmol, 1 äq.) Neamin Hydrochlorid wurden in 145 mL Wasser gelöst. Anschließend wurden 5.36 g (25.6 mmol, 8 äq.) Imidazol-1-sufurylazid Hydrochlorid in 145 mL Wasser gelöst und diese Lösung wurde zur wässrigen Neamin Hydrochlorid Lösung gegeben. Es wurde mit 2 M Natriumhydroxidlösung der pH 6.6 eingestellt und bei Raumtemperatur für 3 Tage gerührt und der pH Wert regelmäßig kontrolliert. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (2:1:1, v:v:v, Chloroform : Methanol : 17 %ige ammoniakalische Lösung; obere Phase). Das Lösungsmittel der vereinigten Fraktionen wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde bis zur trockne eingengt.

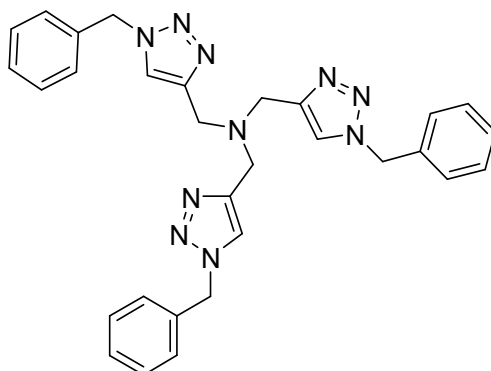
349 mg (1.02 mmol, 32 %) leicht gelbliches Öl | $R_f = 0.68$ (2:1:1, Chloroform : Methanol : 17 %ige ammoniakalische Lösung; obere Phase) | ¹H-NMR (D₂O, 500 MHz) δ [ppm] = 5.38 (d, $J = 3.8$ Hz, 1 H, 1'CH), 4.00 (ddd, $J = 3.0, 7.6, 10.3$ Hz, 1 H, 5'CH), 3.55 (m, 2 H, 4-CH, 3'CH), 3.45 (m, 2 H, 5-CH, 4'CH), 3.26 (m, 2 H, 6'CH), 3.15 (m, 1 H, 6CH), 3.03 (dd, $J = 7.6, 13.5$ Hz, 1 H, 2'CH), 2.81 (m, 1 H, 1CH), 2.76 (dd, 1 H, $J = 3.8, 10.4$ Hz, 1 H, 3CH), 2.20 (td, $J = 4.4, 12.8$ Hz, 1 H, 2_{ax}CH), 1.40 (q, $J = 12.4$ Hz, 1 H, 2_{äq}CH). | ¹³C-APT-NMR (D₂O, 126 MHz) δ [ppm] = 98.8 (1'CH), 80.1 (5'CH), 75.9 (5CH), 75.6 (6CH), 72.8 (3'CH), 71.1 (4'CH), 69.2 (4CH), 56.6 (2'CH), 54.7 (1CH), 49.7 (3CH), 40.7 (6'CH₂), 32.2 (2CH₂). | ESI-HRMS m/z für [C₁₂H₂₅N₆O₆]⁺ 349.1830, gef. 349.1831.

5.2.15 Benzylazid



7.2 g (42 mmol, 1 äq.) Benzylbromid wurden in 180 mL *N,N*-Dimethylformamid verdünnt und anschließend wurden 6.82 g (105 mmol, 2.5 äq.) Natriumazid hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde mit 150 mL Diethylether verdünnt und sechsmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt.

4.67 g (35.1 mmol, 84 %) farbloses Öl | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 7.45 – 7.36 (m, 5 H, C_{arH}), 4.36 (s, 2 H, CH_2). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 135.3 ($\text{C}_{\text{ar,qH}}$), 128.7 (C_{arH}), 128.2 (C_{arH}), 128.1 (C_{arH}), 54.6 (CH_2).

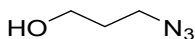
5.2.16 Tris[benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin TBTA

660 mg (5 mmol, 1 äq.) Tripropargylamin wurden unter Eiskühlung in 7.5 mL Acetonitril verdünnt. Im Anschluss wurden nacheinander zunächst 3.00 g (22.5 mmol, 4.5 äq.) Benzylazid, 590 μL (5 mmol, 1 äq.) 2,6-Lutidin und 24 mg (1.3 mol-% bezogen auf die Gesamtalkineinheit) Tetrakis(acetonitril)-Kupfer(I)-hexafluorophosphat ($\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für fünf Tage gerührt. Das erhaltene Rohprodukt wurde vorsichtig mit wenig kaltem Acetonitril unter verminderten Druck gewaschen und anschließend getrocknet.

1.72 g (3.42 mmol, 69 %) weißer Feststoff | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 7.65 (s, 3 H, $\text{N-C}_{\text{arH-Cq}}$), 7.35 – 7.34 (m, 9 H, C_{arH}), 7.26 – 7.24 (m, 6 H, C_{arH}), 5.50 (s, 6 H, Ph-CH_2), 3.69 (s, 6 H, CH_2). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 144.3 ($\text{C}=\text{CH}$), 134.7 ($\text{C}_{\text{q,arH}}$), 129.1

(C_{ar}H), 128.6 (C_{ar}H), 128.0 (C_{ar}H), 123.7 (C=CH), 54.1 (CH₂), 47.1 (CH₂). | ESI-HRMS *m/z* für [C₃₀H₃₁N₁₀]⁺ 531.2728, gef. 531.2736 .

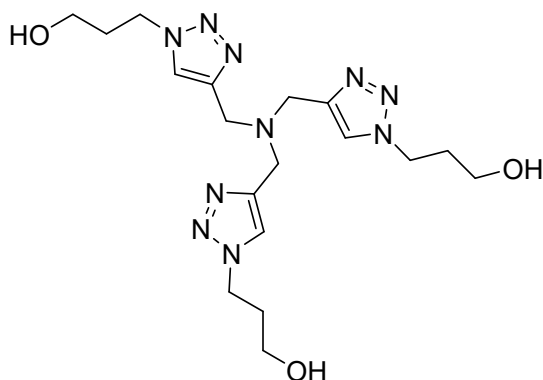
5.2.17 3-Azido-propan-1-ol



6.6 mL (79.3 mmol, 1 äq.) 3-Chloropropan-1-ol wurden in 150 mL *N,N*-Dimethylformamid verdünnt. Es wurden nacheinander 9.20 g (141.2 mmol, 1.78 äq.) Natriumazid und eine Spatelspitze [18]-Krone-6 hinzugegeben. Es wurde für zwei Tage bei 60 °C gerührt. Im Anschluss wurden mit 100 mL Diethylether verdünnt und mit siebenmal mit 100 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel behutsam (max. 500 mBar) unter verminderten Druck entfernt und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

0.91 g (31 % in *N,N*-Dimethylformamid und Diethylether) gelbliches Öl | ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ [ppm] = 3.75 (t, *J* = 6.0 Hz, 2 H, CH₂-OH), 3.40 (m, 2 H, CH₂), 1.83 (td, 2 H, *J* = 6.5, 12.5 Hz, 2 H, CH₂-N₃), 1.77 (brs, 1 H, OH) | ¹³C-APT-NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ [ppm] = 59.8 (CH₂-OH), 48.5 (CH₂-N₃), 31.4 (CH₂).

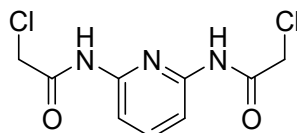
5.2.18 Tris[(1-hydroxypropyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin THPTA



290 mg (2.20 mmol, 1 äq.) Tripropargylamin wurden unter Eiskühlung in 4 mL Acetonitril verdünnt und nacheinander 1.00 g (9.89 mmol, 4.5 äq) 3-Azido-propan-1-ol, 40 µL (2.20 mmol, 1 äq.) 2,6-Lutidin und 32 mg (1.3mol-% bezogen auf die Gesamtalkineinheit) Cu(MeCN)₄PF₆ hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur gebracht und für vier Tage gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit kaltem Acetonitril überschichtet und über Nacht in Kälte auskristallisiert. Der Überstand wurde unter verminderten Druck abfiltriert und der erhaltene Feststoff getrocknet.

0.59 g (1.37 mmol, 14 %) weißer Feststoff | $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz) δ [ppm] = 7.82 (s, 3 H, $\text{C}_q=\text{CH}$), 4.37 (t, J = 6.9 Hz, 6 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.66 (s, 6 H, N-CH_2), 3.44 (t, J = 6.2 Hz, 6 H, O-CH_2), 1.99 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (D_2O , 126 MHz) δ [ppm] = 143.2 ($\text{C}_q=\text{CH}$), 125.3 ($\text{C}_q=\text{CH}$), 58.1 (O-CH_2), 47.2 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 31.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

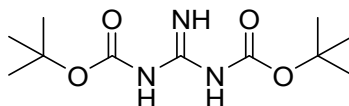
5.2.19 *N,N'*-Di-chloracetyl-2,6-diaminopyridin



Unter Argon wurden 1.09 g (10 mmol, 1 äq.) 1,6-Diaminopyridin in 15 mL Toluol suspendiert und anschließend wurden 2 mL (14.4 mmol, 1.5 äq.) Triethylamin addiert. Unter Eiskühlung wurden langsam 1.98 mL (25 mmol, 2.5 äq.) Chloracetylchlorid hinzugegeben. Anschließend wurde für 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck abfiltriert und der Rückstand in *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen. Zur klaren Lösung wurde Wasser hinzugegeben bis ein Niederschlag auftrat. Um das Produkt zu isolieren wurde das Lösungsmittel unter verminderten Druck abfiltriert.

726 mg (2.77 mmol, 28 %) rostbraune Kristalle | $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 500 MHz) δ [ppm] = 10.45 (s, 2 H, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 7.83 – 7.74 (m, 3 H, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$, NH), 4.38 (s, 4 H, CH_2). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (DMSO-d_6 , 126 MHz) δ [ppm] = 165.4 ($\text{C}_q=\text{O}$), 149.7 (2, $6\text{C}_{\text{q,ar}}$), 140.5 (3, $5\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 109.4 ($4\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 43.4 (CH_2). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2]^+$ 262.0145, gef. 262.0147.

5.2.20 *N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonylguanidin

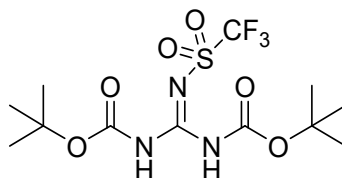


5 g (52.3 mmol, 1 äq.) Guanidin Hydrochlorid wurden in 104 mL 1,4-Dioxan gelöst. Unter Eiskühlung wurden 52 mL 4 M Natriumhydroxidlösung hinzugegeben. Nachfolgend wurden 22.8 g (104.6 mmol, 2 äq.) Di-*tert*-butyl-di-carbonat portionsweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 50 mL Essigsäureethylester verdünnt. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL 10 %iger Zitronensäure, 100 mL Wasser und zweimal mit 50 mL gesättigter

Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (100 % Dichlormethan → 6 % Methanol in Dichlormethan) aufgereinigt.

4.72 g (18.2 mmol, 35 %) weißer Feststoff | R_f = 0.50 (6 % Methanol in Dichlormethan) | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 1.45 (s, 18 H, CH_3). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 158.3 (HN- $\text{C}_q\text{O-O}$), 67.0 ($\text{C}_q\text{-CH}_3$), 28.0 (CH_3). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4]^+$ 260.1605, gef. 260.1606.

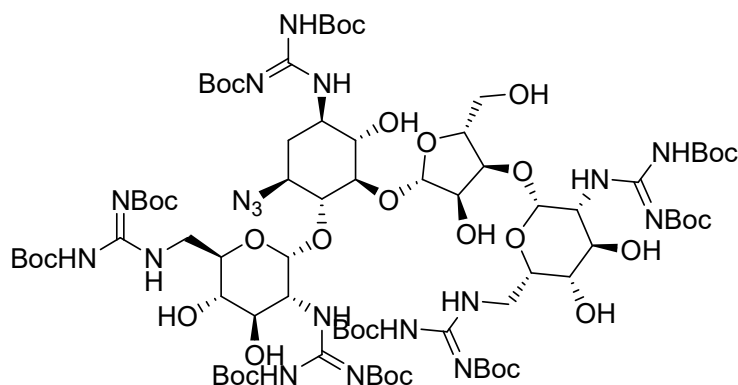
5.2.20 *N,N'*-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-*N''*-triflylguanidin



Unter Argon wurden 4.27 g (18.2 mmol, 1 äq.) *N,N'*-Di-*tert*-butyloxycarbonylguanidin in 90 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 2.5 mL (18.2 mmol, 1 äq.) Triethylamin hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Anschließend wurden über 30 min 3.1 mL (5.13 mmol, 1 äq.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid, sodass die Temperatur konstant blieb. Das Reaktionsgemisch wurde für 3.5 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und nachfolgend auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Es wurden 50 mL 2 M Natriumhydrogensulfathydratlösung bis zu einem Temperaturanstieg zu $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hinzuge tropft und dabei stark gerührt. Die entstandenen Phasen wurden sofort getrennt. Die organische Phase wurde in der Reihenfolge mit Wasser, zweimal 2 M Natriumsulfathydratlösung, Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (100 % Dichlormethan → 5 % Methanol in Dichlormethan) aufgereinigt.

2.54 g (6.49 mmol, 36 %) weißer Feststoff | R_f = 0.84 (6 % Methanol in Dichlormethan) | $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 500 MHz) δ [ppm] = 11.06 (brs, 2 H, NH), 1.46 (s, 18 H, CH_3). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (DMSO-d_6 , 126 MHz) δ [ppm] = 152.2 (HN- $\text{C}_q\text{N-NH}$), 150.0 (HN- $\text{C}_q\text{O-O}$), 120.3 (CF_3), 117.7 (CF_3), 83.3 (C_qCH_3), 27.4 (CH_3). | ESI-HRMS m/z für $[\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6\text{S}]^-$ 390.0952, gef. 390.0953.

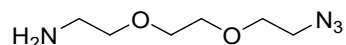
5.2.21 3-Azido-(1,2',6',2''',6'''-penta(di-tert-butyloxycarbonylguanidino))neomycin



Es wurden 409 mg (0.64 mmol, 1 äq) 3-Azidoneomycin in 6 mL Milliporewasser gelöst. Im Wechsel wurden 2.50 g (6.38 mmol, 2 äq. Pro Aminogruppe) *N,N'*-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-*N''*-triflylguanidin und 30 mL Methanol hinzugegeben. Es wurde für fünf Minuten stark gerührt und anschließend 1.77 mL (12.8 mmol, 4 äq. Pro Aminogruppe) Triethylamin hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter verminderten Druck eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (2 % Methanol in Dichlormethan) aufgereinigt.

0.79 g (0.43 mmol, 67 %) weißer Feststoff | R_f = 0.27 (3 % Methanol in Dichlormethan) | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 11.34 (brs, 2 H, NH), 9.37 (s, 1 H, NH), 8.93 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, NH), 8.58 (d, J = 23.6 Hz, 2 H), 5.51 (d, J = 4.1 Hz, 1 H, 1'CH), 5.11 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, 1''CH), 4.98 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, 1'''CH), 4.37 (m, 5 H, CH), 3.97 (m, 13 H, CH, CH_2), 3.59 (m, 7 H, CH, CH_2), 3.32 (dd, J = 7.0, 16.8 Hz, 3 H, CH, CH_2), 2.35 (m, 1 H, 2_{ax}CH), 1.61 (dd, J = 9.6, 20.8 Hz, 1 H, 2_{äq}CH), 1.48 (m, 90 H, CH_3). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 162.0 (HN- $\text{C}_q\text{N-NH}$), 157.5 (HN- $\text{C}_q\text{N-NH}$), 152.9 (HN- $\text{C}_q\text{O-O}$), 123.2 (NC- $\text{C}_q\text{O-O}$), 120.7 (NC- $\text{C}_q\text{O-O}$), 118.1 (NC- $\text{C}_q\text{O-O}$), 115.6 (NC- $\text{C}_q\text{O-O}$), 108.5 (1''CH), 99.0 (1'''CH), 96.4 (1'CH), 84.0 (C_qCH_3), 83.9 (C_qCH_3), 83.7 (C_qCH_3), 83.6 (C_qCH_3), 81.5 (5CH), 80.4 (C_qCH_3), 80.1 (C_qCH_3), 80.0 (C_qCH_3), 79.9 (C_qCH_3), 78.0 (CH), 76.6 (CH), 76.0 (CH), 75.0 (CH), 74.2 (CH), 73.0 (CH), 72.8 (CH), 71.5 (CH), 70.0 (CH), 65.8 (CH), 61.0 (5''CH₂), 59.6 (CH), 53.7 (CH), 52.3 (CH), 50.8 (CH), 49.7 (CH), 41.1 (6'''CH₂), 39.9 (6'CH₂), 32.4 (2CH₂), 28.1 (CH₃), 28.0 (CH₃). | ESI-MS m/z für $[\text{C}_{78}\text{H}_{135}\text{N}_{18}\text{O}_{33}]^+$ 1851.9, gef. 1851.3.

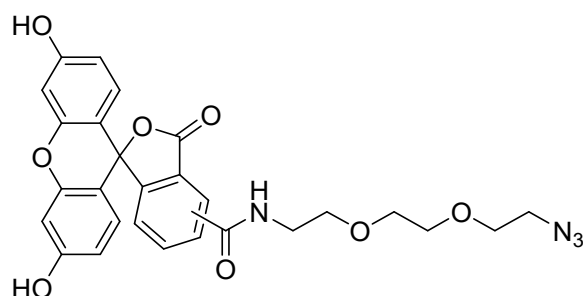
5.2.22 [2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanazid



2.50 ml (16.0 mmol, 1 äq.) 1,2-Bis(2-Chloroethoxyethan) wurden in 75 mL *N,N* Dimethylformamid verdünnt und nacheinander 3.42 g (52.7 mmol, 3.3 äq.) Natriumazid und eine Spatelspitze [18]-Krone-6 hinzugegeben. Es wurde für zwei Tage bei 60 °C gerührt. Im Anschluss wurden mit 200 mL Wasser verdünnt und mit fünfmal 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und behutsam das Lösungsmittel unter verminderten Druck (max. 500 mBar) entfernt. Das erhaltene Bisazid wurde in 45 ml eines Gemisches von Diethylether : Tetrahydrofuran : 1 M Salzsäure (1:1:0.1) verdünnt. 4.06 g (15.5 mmol, 0.97 äq.) Triphenylphosphan wurden in 23 mL Diethylether gelöst und langsam zur Reaktionslösung hinzuge tropft. Es wurde sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 50 ml Diethylether gegossen und dreimal mit 100 mL 1 M Salzsäure extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Natriumhydroxidpellets auf pH 14 eingestellt und mit dreimal 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel behutsam unter verminderten Druck (max. 500 mBar) entfernt und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

2.19 g (30 % in Dichlormethan und Tetrahydrofuran) gelbliches Öl | $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ [ppm] = 3.69 – 3.62 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-O}$) 3.52 – 3.50 (m, 2 H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 3.39 – 3.37 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 2.86 (t, J = 5.2 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$). | $^{13}\text{C-APT-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ [ppm] = 73.6 ($\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 70.7 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 70.3 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 70.0 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 50.6 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 41.8 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

5.2.23 *N*-([2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanazid)-5(6)-Fluoresceinamid



Unter Argon wurden 690 mg (1.83 mmol, 1.5 äq.) 5(6)-Carboxyfluorescein in 12 ml Tetrahydrofuran und *N,N*-Dimethylformamid (2:1, v:v) vorgelegt. Im Anschluss wurden 340 μl

(2.19 mmol, 1.8 äq.) Diisopropylcarbodiimid und 253 mg (2.19 mmol, 1.8 äq.) *N*-Hydroxysuccinimid hinzugefügt. Es wurde über Nacht gerührt. Anschließend wurden 212 mg (1.22 mmol, 1 äq.) [2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanazid verdünnt in 13 mL eines Boratpuffer (pH 8.5)-*N,N*-Dimethylformamid-Gemisches (1:1, v:v) hinzuge tropft und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter verminderten Druck eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (4 % Methanol in Dichlormethan → 10 % Methanol in Dichlormethan) aufgereinigt.

474 mg (0.89 mmol, 73 %) | $R_f = 0.76$ (15 % Methanol in Dichlormethan) | UPLC-MS $t_R = 1.77$ und 1.82 min (5 – 90 % Methanol in Wasser in 2 min), m/z für $[C_{27}H_{24}N_4O_8Na]^+$ 555.1, gef. 555.3; m/z für $[C_{27}H_{25}N_4O_8]^+$ 533.1, gef. 533.3.

5.3 Synthesevorschriften für die Festphasenpeptidsynthesen

5.3.1 Verwendete Harze

Für die Synthese an fester Phase wurde das Harz NovaPEG-Rink Amid mit einem Rink-Amid-Linker und den Beladungsgrößen 0.37 – 0.54 mmol/g verwendet.

5.3.2 Verwendete Aminosäuren und PNA-Monomere

Alanin (Ala, A, Fmoc-Ala-OH · H₂O), Arginin (Arg, R, Fmoc-Arg(Pbf)-OH), Asparagin (Asn, N, Fmoc-Asn(Trt)-OH), Asparaginsäure (Asp, D, Fmoc-Asp(OtBu)-OH) Cystein (Cys, C, Fmoc-Cys(Mmt)-OH und Fmoc-Cys(Trt)-OH), Glutamin (Gln, Q, Fmoc-Gln(OtBu)-OH), Glutaminsäure (Glu, E, Fmoc-Glu(Trt)-OH), Glycin (Gly, G, Fmoc-Gly-OH), Histidin (His, H, Fmoc-His(Trt)-OH), Isoleucin (Ile, I, Fmoc-Ile-OH), Leucin (Leu, L, Fmoc-Leu-OH), Lysin (Lys, K, Fmoc-Lys(Boc)-OH und Fmoc-Lys(tfa)-OH), Methionin (Met, M, Fmoc-Met-OH), Phenylalanin (Phe, F, Fmoc-Phe-OH), Prolin (Pro, P, Fmoc-Pro-OH), Serin (Ser, S, Fmoc-Ser(OtBu)-OH), Threonin (Thr, T, Fmoc-Thr(OtBu)-OH), Tryptophan (Trp, W, Fmoc-Trp(Boc)-OH), Tyrosin (Tyr, Y, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH), Valin (Val, V, Fmoc-Val-OH) und Propargylglycin (Pra, Fmoc-Pra-OH).

a (Fmoc-PNA-A(Bhoc)-OH), c (Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH), g (Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH) und t (Fmoc-PNA-T(Bhoc)-OH).

5.3.3 Allgemeine Vorschrift zur manuellen Festphasenpeptidsynthese

Entsprechend des Reaktionsansatzes wurde die benötigte Menge an Harz eingewogen, in den Spritzenreaktor überführt und in *N,N*-Dimethylformamid für 30 min bei 350 rpm gequellt.

Kupplung der Aminosäuren

Es wurden 6 äq. (0.1 mol/L) der gewünschten Aminosäure mit 5.9 äq. HCTU in *N,N*-Dimethylformamid gelöst und kurze Zeit voraktiviert. Anschließend wurden 12 äq. *N*-Methylmorpholin (NMM) hinzugegeben. Nach Überführung in den Spritzenreaktor wurden für 45 min bei 350 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde in der Reihenfolge fünfmal *N,N*-Dimethylformamid, fünfmal Dichlormethan, fünfmal *N,N*-Dimethylformamid gewaschen. Für die Synthese mit niedrigeren Beladungsgrad des Harzes erfolgte die Kupplung mit 3 äq. (0.1 mol/l) der ersten Aminosäure, 2.9 äq. HCTU und 6 äq. NMM in *N,N*-Dimethylformamid.

Kupplung der PNA-Monomere

Es wurden 6 äq. (0.1 mol/l) des gewünschten PNA-Monomers mit 4 äq. Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBoB) in *N,N*-Dimethylformamid gelöst und kurze Zeit voraktiviert. Anschließend wurden 8 äq NMM hinzugegeben. Nach Überführung in den Spritzenreaktor wurden für 45 min bei 350 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde in der Reihenfolge fünfmal *N,N*-Dimethylformamid, fünfmal Dichlormethan, fünfmal *N,N*-Dimethylformamid gewaschen.

Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde nach dem Standard-Fmoc-Protokoll durchgeführt. Dazu wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren (4 äq.) mit HCTU (4. Äq.) und NMM (8 äq.) in *N,N*-Dimethylformamid aktiviert und gekuppelt. Ab der 10. Aminosäure wurde zweifach gekuppelt. Die Peptide wurden N-terminal Fmoc-geschützt erhalten.

Capping

Das Acetylieren nicht genutzter Aminofunktionen und des *N*-Terminus nach Kupplung der letzten Aminosäure erfolgte mit einer Lösung von 5 % Essigsäureanhydrid und 6 % 2,6-Lutidin in *N,N*-Dimethylformamid. Es wurde zweimal 5 min bei 350 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde in der Reihenfolge fünfmal *N,N*-Dimethylformamid, fünfmal Dichlormethan, fünfmal *N,N*-Dimethylformamid gewaschen.

Entschützen des N-Terminus

Die Demaskierung von der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit einer Lösung von 20 % Piperidin in *N,N*-Dimethylformamid. Es wurde zweimal fünf min bei 350 rpm geschüttelt. Anschließend wurde in der Reihenfolge fünfmal *N,N*-Dimethylformamid, fünfmal Dichlormethan, fünfmal *N,N*-Dimethylformamid gewaschen.

Bestimmung des Reaktionsumsatzes und Freisetzung vom Harz zur Reaktionskontrolle

Der Reaktionsumsatz und der Beladungsgrad des Harzes wurde mit Hilfe der Konzentrationsbestimmungen des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes ($\lambda = 301 \text{ nm}$, $\epsilon_{301} = 7800 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) am *NanoDrop ND-1000* Spektrometer bestimmt. Die Freisetzung vom Harz zur Reaktionskontrolle erfolgte mit $\sim 1 \text{ mg}$ des Harzes in einer Reaktionslösung von TFA: $\text{Pr}_3\text{SiH}:\text{H}_2\text{O}$ (95:2.5:2.5; v:v:v, Triisopropylsilan).

Zyklisierung an fester Phase

Zunächst wurde das Harz mit 3 % TFA in $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Pr}_3\text{SiH}$ (95:5) für 4 x 15 min behandelt um die Mmt-Gruppe selektiv in der Seitenkette des Cysteins zu demaskieren. Das Harz wurde nachfolgend nacheinander mit fünfmal *N,N*-Dimethylformamid, fünfmal Dichlormethan und zehnmal *N,N*-Dimethylformamid gewaschen. Im Anschluss wurde das Harz mit einer Lösung von TCEP (2 eq.) in *N,N*-Dimethylformamid für 2 h bei Raumtemperatur behandelt. Das Harz wurde in selber Reihenfolge gewaschen. Die Zyklisierung erfolgte mit einer Reaktionslösung aus Linker (1.5 äq.), Triethylamin (3 äq.) und katalytischen Mengen TBAB in *N,N*-Dimethylformamid unter Argon über Nacht bei Raumtemperatur.

CuAAC an fester Phase

Die CuAAC an fester Phase (5 mol/L) erfolgte mit 3-Azido-Neomycin (Neo) (10 äq.), 3-Azido-Neamin (Nea) (10 äq.), 3-Azido-boc-guandinoneomycin (Neo(GuaBoc)) (10 äq.) oder FAM-Azid, TBTA (10 äq.) oder THPTA (10 äq.), Kuper-II-sulfat-pentahydrat (10 äq.) und Natriumaskorbat (20 äq.) unter Argon. Die CuAAC von Neo und Nea erfolgte mit THPTA in Wasser und von NeoGuaBoc mit TBTA in einem *N,N*-Dimethylformamid-Wasser-Gemisch. Es wurde für 3 d bei Raumtemperatur geschüttelt.

Guanidinylierung an fester Phase

Das Harz (0.007 mol/L) wurde mit einer Lösung des *Goodman's Reagent* (15 äq. pro Aminofunktion) und Triethylamin (30 äq. pro Aminofunktion) in einem Methanol-Wasser-Gemisch (5:1; v:v) für 5 d bei Raumtemperatur behandelt. Es wurde anschließend mit fünfmal Methanol, fünfmal Wasser und fünfmal Methanol gewaschen.

Freisetzung vom Harz und Aufarbeitung des Peptids

Die Freisetzung vom Harz und die Demaskierung der Seitenkettenfunktionen der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit einer Lösung aus 0.2 ml/ μ mol TFA: i Pr₃SiH:H₂O (95:2.5:2.5, v:v:v) für vier Stunden bei 350 rpm. Im Anschluss wurde das Harz mit Trifluoressigsäure nachgespült und die vereinigten Trifluoressigsäurephasen mit kaltem Diethylether über Nacht gefällt. Anschließend wurde bei 4000 rpm für fünf min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das erhaltene Rohprodukt getrocknet und in Milliporewasser, Milliporewasser : Acetonitril (50:50; v:v) oder 0.1 TFA in Wasser : Acetonitril (50:50; v:v) aufgenommen und an einer semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Bestimmung der Konzentration der Peptide

Die Konzentration der erhaltenen Peptide wurde mit Hilfe der enthaltenen Tyrosin- ($\lambda = 280$ nm, $\epsilon_{280} = 1280$ Lmol⁻¹cm⁻¹) und Tryptophanreste ($\lambda = 280$ nm, $\epsilon_{280} = 5690$ Lmol⁻¹cm⁻¹) am NanoDrop ND-1000 Spektrometer durch Absorptionsmessung bestimmt.

Gravimetrische Bestimmung der Peptide

Peptide, die weder Tyrosin- noch Tryptophanreste enthalten, wurden gravimetrisch bestimmt. Dabei wurden zur jeweiligen molaren Masse der Peptide TFA-Addukte spezifisch zur Sequenz für Lysin, Histidin, Arginin, Neomycin, Neamin, NeoGua, den PNA-Monomeren und den freien N-Terminus hinzuaddiert.

FACS-Messung

Die FACS-Messung wurde von *M. MSc. Li-Wei Kuo* durchgeführt.

Kaiser Test

Einige Harzkugeln in einem Glasgefäß wurden mit jeweils drei Tropfen Phenol (80% in Ethanol), Kaliumcyanid (in Wasser/Pyridin) und Ninhydrin (6% in Ethanol) versetzt und für fünf Minuten auf 120 °C erhitzt. Ein Farbumschlag zu blau weist auf freie Amine hin.

5.4 Synthese der Peptide

Allgemeine Vorschrift für die Zyklisierung von Peptiden ohne Alkin: Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus acetyliert. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss daran wurde an fester Phase zyklisiert und die Freisetzung vom Harz erfolgte. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt und nach Lyophilisieren erhalten.

AcNHCWHYRCCONH2 cP1

1.08 mmol/L (0.5 mL, 8.1 %) | UPLC-MS t_R = 1.57 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{49}H_{60}N_{16}O_{10}S_2]$ m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1115.4, gef. 1115.5; m/z für $[M+2H]^2+$ 549.2, gef. 548.4. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1115.4295, gef. 1116.2428.

AcNHCKRYSHCCONH2 cP2

0.609 mmol/L (0.5 mL, 3.8 %) | UPLC-MS t_R = 1.29 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{47}H_{67}N_{17}O_{12}S_2]$ m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1144.4, gef. 1144.6; m/z für $[M+2H+H_2O]^2+$ 572.7, gef. 573.0; m/z für $[M+3H+H_2O]^3+$ 382.1, gef. 382.9. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1144.4771, gef. 1143.2992.

AcNHCRSYHWKKCCONH2 cP3

0.313 mmol/L (0.5 mL, 1.4 %) | UPLC-MS t_R = 1.44 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{64}H_{89}N_{21}O_{14}S_2]$ m/z für $[M+2H+H_2O]^2+$ 729.8, gef. 730.4; m/z für $[M+3H+H_2O]^3+$ 486.8, gef. 487.2. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1458.6507, gef. 1458.3225.

AcNHCKHCCONH2 cP4

0.12 mg (0.14 µmol, 1.7 %) | UPLC-MS t_R = 1.13 und 1.25 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{29}H_{31}N_{11}O_7S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 742.2, gef. 742.5; m/z für $[M+H]^+$ 720.2, gef. 720.3; m/z für $[M+2H]^2+$ 360.6, gef. 360.6. | MALDI-TOF m/z für $[M+K]^+$ 759.2260, gef. 758.1171; m/z für $[M+H]^+$ 738.2807, gef. 739.8006.

AcNHCRWSCCONH2 cP5

0.68 mmol/L (0.4 mL, 3.1 %) | UPLC-MS t_R = 1.49 und 1.63 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{37}H_{49}N_{13}O_9S_2]$ m/z für $[M+H]^+$ 884.3, gef. 884.3; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 442.6, gef. 442.9. | MALDI-TOF m/z für $[M+K]^+$ 923.2846, gef. 923.4252; m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 902.3393, gef. 902.7977; m/z für $[M+H]^+$ 884.3287, gef. 882.5360.

Allgemeine Vorschrift für die Zyklisierung von Peptiden mit Alkin: Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus acetyliert. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss wurde an fester Phase zyklisiert. Die Freisetzung vom Harz erfolgte. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt und nach Lyophilisieren erhalten.

AcNHCY-Pra-SRKCCONH₂ **cP6**

5.929 mmol/L (0.1 mL, 2.1 %) | UPLC-MS t_R = 1.34 und 1.46 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{46}H_{65}N_{15}O_{12}S_2]$ m/z für $[M+H]^+$ 1084.4, gef. 1084.5; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 542.7, gef. 542.9; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 362.1, gef. 362.3. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1102.4553, gef. 1104.2002.

AcNHCWK-Pra-YHCCCONH₂ **cP7**

1.393 mmol/L (0.1 mL, 0.5 %) | UPLC-MS t_R = 1.52 und 1.63 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{54}H_{65}N_{15}O_{11}S_2]$ m/z für $[M+H]^+$ 1164.4, gef. 1164.3; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 582.7, gef. 582.9; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 388.8, gef. 389.1. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1182.4604, gef. 1184.9272.

AcNHCY-Pra-SCCCONH₂ **cP8**

2.071 mmol/L (0.1 mL, 1.0 %) | UPLC-MS t_R = 1.56 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{35}H_{41}N_9O_{10}S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 822.2, gef. 822.3; m/z für $[M+H]^+$ 800.2, gef. 800.3. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 818.2593, gef. 820.5160.

AcNHC-Pra-YHCCCONH₂ **cP9**

3.193 mmol/L (0.1 mL, 1.4 %) | UPLC-MS t_R = 1.53 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{37}H_{43}N_{11}O_9S_2]$ m/z für $[M+H]^+$ 850.2, gef. 850.4; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 425.6, gef. 426.0. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 868.2862, gef. 870.2864.

AcNHCY-Pra-RHCCCONH₂ **cP10**

1.186 mmol/L (0.1 mL, 1.9 %) | UPLC-MS t_R = 1.47 min (3 – 60 % B in 2.5 min), $[C_{43}H_{55}N_{15}O_{10}S_2]$ m/z für $[M+H]^+$ 1006.3, gef. 1006.4; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 503.6, gef. 503.6; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 336.1, gef. 335.5. | MALDI-TOF m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1024.3873, gef. 1026.6030.

Allgemeine Vorschrift für die Zyklisierung von Peptiden als Zwischenprodukt: Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus acetyliert. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss daran wurde an fester Phase zyklisiert. Zur Reaktionskontrolle wurde eine weitere Testspaltung vorgenommen.

AcNHCY-Pra-SC^{CONH2} **cP11**

UPLC-MS: $t_R = 3.06$ min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{34}H_{41}N_9O_{10}S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 822.2, gef. 822.1; m/z für $[M+H]^+$ 800.2, gef. 800.2; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 400.6, gef. 400.7.

AcNH[R(pbf)]RRRC^{CONH2}YK-Pra-C^{CONH2} **cP12**

UPLC-MS: $t_R = 2.99$ min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{74}H_{112}N_{26}O_{16}S_2]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 859.3, gef. 859.2; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 573.2, gef. 573.3; m/z für $[M+4H]^{4+}$ 430.2, gef. 430.5.

AcNHC-Pra-SYWC^{CONH2} **cP14**

UPLC-MS: $t_R = 4.05$ min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{45}H_{51}N_{11}O_{11}S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 1000.2, gef. 1000.8; m/z für $[M+H]^+$ 986.3, gef. 986.2; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 493.6, gef. 493.9.

AcNHCHY-Pra-C^{CONH2} **cP15**

UPLC-MS: $t_R = 2.79$ min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{37}H_{44}N_{11}O_9S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 872.2, gef. 872.1; m/z für $[M+H]^+$ 850.2, gef. 850.2; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 425.6, gef. 425.6.

AcNHC-Pra-VYC^{CONH2} **cP16**

UPLC-MS: $t_R = 2.92$ min (3 – 60 % B in 6 min).

AcNHCY-Pra-HKC^{CONH2} **cP17**

UPLC-MS: $t_R = 2.19$ min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{43}H_{55}N_{13}O_{10}S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 1000.3, gef. 1000.8; m/z für $[M+H]^+$ 978.3, gef. 978.7.

AcNHC-Pra-VYC^{CONH2} **cP18**

UPLC-MS: $t_R = 3.45$ min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{36}H_{46}N_9O_9S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 834.2, gef. 834.2; m/z für $[M+H]^+$ 812.2, gef. 812.2.

AcNHCSW-Pra-YPC^{CONH2} **cP19**

UPLC-MS: Es wurde keine Testspaltung vorgenommen.

AcNHCY-Pra-PC^{CONH2} **cP30**

UPLC-MS: t_R = 3.31 min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{36}H_{63}N_9O_9S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 832.2, gef. 832.3; m/z für $[M+H]^+$ 810.2, gef. 810.3; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 405.6, gef. 405.7.

Allgemeine Vorschrift für die CuAAC von zyklisierten Peptiden: Die CuAAC wurde gemäß dem oben beschriebenen Protokoll an den zyklisierten Peptiden durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das Peptid vom Harz freigesetzt und das Rohprodukt mit Hilfe der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Das Peptid wurde nach anschließendem Lyophilisieren erhalten.

AcNHCY [Pra-Neo] SC^{CONH2} **cP-A11**

0.250 mmol/L (0.2 mL, 0.6 %) | UPLC-MS: t_R = 1.66 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{57}H_{85}N_{17}O_{23}S_2]$ m/z für $[M+2H+2TFA]^{2+}$ 994.3, gef. 994.9; m/z für $[M+3H+5TFA]^{3+}$ 777.2, gef. 776.3; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 587.6, gef. 587.6. | MALDI-TOF: m/z für $[M+H]^+$ 1759.7245, gef. 1754.7681.

AcNHRRRRCYK [Pra-Nea]C^{CONH2} **cP-A12**

0.72 mmol/L (0.2 mL, 3.2 %) | UPLC-MS: t_R = 1.41 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{73}H_{120}N_{36}O_{19}S_2]$ m/z für $[M+2H+2TFA]^{2+}$ 1021.4, gef. 1021.5; m/z für $[M+2H+TFA]^{2+}$ 964.4, gef. 964.6; m/z für $[M+3H+3TFA]^{3+}$ 644.4, gef. 643.2; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 605.3, gef. 605.4; m/z für $[M+4H]^{4+}$ 454.2, gef. 454.5. | MALDI-TOF: m/z für $[M+H]^+$ 1813.8917, gef. 1809.4064; m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1831.9023, gef. 1831.3299. | ESI-HRMS: m/z für $[M+2H+2TFA]^{2+}$ 1021.4421, gef. 1021.9401.

AcNHRRRRCYK [Pra-Neo]C^{CONH2} **cP-A13**

1.047 mmol/L (0.2 mL, 4.6 %) | UPLC-MS: t_R = 1.48 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{84}H_{140}N_{34}O_{26}S_2]$ m/z für $[M+2H+TFA]^{2+}$ 1167.5, gef. 1168.1; m/z für $[M+2H+Na+2TFA]^{3+}$ 786.0, gef. 787.7; m/z für $[M+3H+TFA]^{3+}$ 748.0, gef. 749.5. | MALDI-TOF: m/z für $[M+Na]^+$ 2128.0007, gef. 2127.9841; m/z für $[M+H]^+$ 2106.0188, gef. 2101.7228.

AcNHC [Pra-Neo] SYWC^{CONH2} **cP-A14**

0.327 mmol/L (0.5 mL, 0.5 %) | UPLC-MS: t_R = 1.98 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{68}H_{95}N_{19}O_{24}S_2]$ m/z für $[M+Na+K+2TFA]^{2+}$ 901.7, gef. 902.8; m/z für $[M+Na+K]^{2+}$ 853.8, gef. 854.1. | MALDI-TOF: m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1644.6414, gef. 1644.2343.

AcNHCHY [Pra-Nea]C^{CONH2} **cP-A15**

1.703 mmol/L (0.4 mL, 5.9 %) | UPLC-MS: t_R = 1.61 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{49}H_{67}N_{19}O_{22}S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 1220.4, gef. 1221.6; m/z für $[M+H]^+$ 1198.4, gef. 1198.6; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 599.7, gef. 600.1; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 400.1, gef. 400.2. | MALDI-TOF: m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1216.4619, gef. 1215.3111; m/z für $[M+H]^+$ 1198.4513, gef. 1194.4047.

$AcNH\text{---}\underline{C}[Pra-Nea]VY\underline{C}^{CONH_2}$ **cP-A16**

1.22 mmol/L (1.5 mL, 14.5 %) | UPLC-MS: t_R = 1.61 and 1.81 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{48}H_{69}N_{15}O_{15}S_2]$ m/z für $[M+Na]^+$ 1182.4, gef. 1183.3; m/z für $[M+H]^+$ 1160.4, gef. 1160.5; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 580.7, gef. 580.8. | MALDI-TOF: m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1178.4714, gef. 1177.6258.

$AcNH\text{---}\underline{C}Y[Pra-Neo]HK\underline{C}^{CONH_2}$ **cP-A17**

10.33 mmol/L (0.2 mL, 13 %) | UPLC-MS: t_R = 1.47 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{66}H_{99}N_{21}O_{23}S_2]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 810.3, gef. 809.8; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 540.6, gef. 540.8; m/z für $[M+4H+TFA]^{4+}$ 433.2, gef. 433.2; $[M+4H]^{4+}$ 405.4, gef. 406.6. | MALDI-TOF: m/z für $[M+H+H_2O]^+$ 1636.6839, gef. 1636.3713; m/z für $[M+H]^+$ 1618.6733, gef. 1614.2775. | ESI-HRMS: m/z für $[M+2H]^{2+}$ 809.8403, gef. 809.8388.

$AcNH\text{---}\underline{C}[Pra-Nea]VY\underline{C}^{CONH_2}$ **cP-A18**

1.54 mmol/L (0.4 mL, 14.5 %) | UPLC-MS: t_R = 1.70 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{48}H_{69}N_{15}O_{15}S_2]$ m/z für $[M+H]^+$ 1160.4, gef. 1160.5; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 580.9, gef. 580.9; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 387.4, gef. 387.4. | MALDI-TOF: m/z für $[M+Na]^+$ 1182.4427, gef. 1182.8602; m/z für $[M+H]^+$ 1160.4608, gef. 1161.5552. | ESI-HRMS: m/z für $[M+2H]^{2+}$ 580.7340, gef. 580.7337.

$AcNH\text{---}\underline{C}SW[Pra-Neo]YPC^{CONH_2}$ **cP-A19**

2.68 mmol/L (0.3 mL, 5 %) | UPLC-MS: t_R = 1.88 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{73}H_{102}N_{20}O_{25}S_2]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 862.3, gef. 863.3; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 575.2, gef. 575.3. | MALDI-TOF: m/z für $[M+Na]^+$ 1745.6654, gef. 1740.8861. | ESI-HRMS: m/z für $[M+2H]^{2+}$ 862.3454, gef. 862.3439.

Allgemeine Vorschrift zur Synthese und Guanidinylierung von Peptiden: Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus acetyliert. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss daran wurde an fester Phase guanidinyliert. Zur Reaktionskontrolle wurde eine weitere Testspaltung vorgenommen.

$AcNH\text{---}V\text{---}Har\text{---}AG^{CONH_2}$ **gP21**

UPLC-MS: $t_R = 1.52$ min (3 – 40 % B in 5 min), $[C_{19}H_{36}N_8O_5]$ m/z für $[M+H]^+$ 457.2, gef. 457.3.

AcNHHar-A-Har-G^{CONH2} **gP23**

UPLC-MS: $t_R = 1.03$ min (3 – 40 % B in 5 min), $[C_{21}H_{41}N_9O_5]$ m/z für $[M+H]^+$ 528.3, gef. 528.6.

AcNHHar-Har-Har-G^{CONH2} **gP24**

UPLC-MS: $t_R = 0.31$ min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{25}H_{50}N_{14}O_5]$ m/z für $[M+H+TFA]^+$ 741.4, gef. 741.6, m/z für $[M+H]^+$ 627.4, gef. 627.2, m/z für $[M+2H+TFA]^{2+}$ 371.2, gef. 371.5, m/z für $[M+2H]^{2+}$ 314.2, gef. 314.2.

AcNHHar-PPL^{CONH2} **gP25**

UPLC-MS: $t_R = 1.16$ min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{25}H_{46}N_8O_5]$ m/z für $[M+H]^+$ 537.3, gef. 537.2, m/z für $[M+2H]^{2+}$ 269.1, gef. 269.7.

Allgemeine Vorschrift zur CuAAC als Zwischenprodukt: Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus acetyliert. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss daran wurde an fester Phase nach oben beschriebenem Protokoll die CuAAC durchgeführt. Zur Reaktionskontrolle wurde eine weitere Testspaltung vorgenommen.

AcNH[Pra-Neo]LVA^{CONH2} **P-A26**

UPLC-MS: $t_R = 0.75$ min (3 – 40 % B in 5 min), $[C_{44}H_{79}N_{13}O_{18}]$ m/z für $[M+Na]^+$ 1100.5, gef. 1100.6; m/z für $[M+H]^+$ 1078.5, gef. 1078.5.

AcNH[Pra-Nea]LVA^{CONH2} **P-A27**

UPLC-MS: $t_R = 0.90$ min (3 – 40 % B in 4 min), $[C_{33}H_{59}N_{11}O_{11}]$ m/z für $[M+Na]^+$ 808.4, gef. 808.2; m/z für $[M+H]^+$ 786.4, gef. 786.4.

AcNHagagG[Pra-Neo]GG^{CONH2} **PPO-A28**

UPLC-MS: $t_R = 0.52$ min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{80}H_{115}N_{41}O_{28}]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 1049.9, gef. 1050.5; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 700.3, gef. 700.3.

AcNH[Pra-Neo]GGagag^{CONH2} **PPO-A29**

UPLC-MS: $t_R = 0.55$ min (3 – 40 % B in 2.5 min), $[C_{78}H_{126}N_{40}O_{27}]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 681.2, gef. 682.3; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 511.2, gef. 511.3.

AcNHCY[Pra-Neo]PC^{CONH2} **cP-A30**

UPLC-MS: $t_R = 1.07$ min (3 – 40 % B in 4 min), $[C_{59}H_{107}N_{17}O_{22}S_2]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 725.7, gef. 726.1; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 484.1, gef. 483.8; m/z für $[M+4H]^{4+}$ 363.3, gef. 363.6.

Allgemeine Vorschrift 5(6)-Carboxyfluorescein markierter Peptide mit anschließender CuAAC:
Das Peptid/Peptid-PNA-Konjugat wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus nach Vorschrift mit 5(6)-Carboxyfluorescein gekuppelt. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss daran wurde an fester Phase nach oben beschriebenem Protokoll die CuAAC durchgeführt. Zur Reaktionskontrolle wurde eine weitere Testspaltung vorgenommen.

FAMNH[Pra-Nea]LVA^{CONH2} **P-A33**

UPLC-MS: $t_R = 2.36$ min (3 – 40 % B in 4 min), $[C_{52}H_{67}N_{11}O_{16}]$ m/z für $[M+H]^+$ 1102.4, gef. 1102.3; m/z für $[M+2H]^{2+}$ 551.7, gef. 552.4; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 368.1, gef. 368.1.

FAMNH[Pra-Neo]LVA^{CONH2} **P-A34**

UPLC-MS: $t_R = 1.97$ min (3 – 40 % B in 4 min), $[C_{63}H_{87}N_{13}O_{23}]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 697.8, gef. 697.7; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 465.5, gef. 465.6; m/z für $[M+4H]^{4+}$ 349.4, gef. 349.7.

FAMNH[Pra-Neo]GGagag^{CONH2} **PPO-A35**

UPLC-MS: $t_R = 1.07$ min (3 – 40 % B in 4 min), $[C_{97}H_{140}N_{40}O_{32}]$ m/z für $[M+3H]^{3+}$ 786.6, gef. 787.6; m/z für $[M+4H]^{4+}$ 590.2, gef. 590.6.

FAMNH₂agagGG[Pra-Neo]G^{CONH2} **PPO-A36**

UPLC-MS: $t_R = 0.52$ min (3 – 40 % B in 4 min), $[C_{99}H_{123}N_{41}O_{33}]$ m/z für $[M+3H]^{3+}$ 604.4, gef. 605.3.

FAMNH[Pra-Neo]GGtcac^{CONH2} **PPO-A37**

UPLC-MS: $t_R = 1.05$ min (3 – 40 % B in 4 min), $[C_{95}H_{121}N_{33}O_{34}]$ m/z für $[M+3H]^{3+}$ 757.2, gef. 757.8.

FAMNH₂tcacGG[Pra-Neo]G^{CONH2} **PPO-A38**

UPLC-MS: $t_R = 0.55$ min (3 – 40 % B in 4 min).

Allgemeine Vorschrift der Guanidinylierung an fester Phase mit anschließender Aufreinigung:
Die Guanidinylierung wurde gemäß dem oben beschriebenen Protokoll an den Peptiden Peptid-PNA-Oligomeren durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das/die Peptid/Peptid-PNA-

Oligomeren vom Harz freigesetzt und das Rohprodukt mit Hilfe der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Das Peptid/Peptid-PNA-Oligomer wurde nach anschließendem Lyophilisieren erhalten.

AcNH[Pra-Neo(Gua)₅]LVA^{CONH₂} **P-gA26**

0.86 mg (0.46 µmol, 2.8 %) | UPLC-MS: t_R = 1.69 min (3 – 40 % B in 2.5 min), [C₄₉H₈₉N₂₃O₁₈] m/z für [M+2H+TFA]²⁺ 701.8, gef. 702.0; m/z für [M+3H]³⁺ 430.2, gef. 430.7. | MALDI-TOF: m/z für [M+H]⁺ 1288.6827, gef. 1285.3050.

AcNH[Pra-Nea(Gua)₃]LVA^{CONH₂} **P-gA27**

0.99 mg (0.67 µmol, 3.9 %) | UPLC-MS: t_R = 1.62 min (3 – 40 % B in 2.5 min), [C₃₆H₆₅N₁₇O₁₁] m/z für [M+H+TFA]⁺ 1026.5, gef. 1026.8; m/z für [M+2H]²⁺ 456.7, gef. 456.7. | MALDI-TOF: m/z für [M+H]⁺ 911.5047, gef. 913.7822.

AcNH₂agagG[Pra-Neo(Gua)₂]GG^{CONH₂} **PPO-gA28**

0.3 mg (0.09 µmol, 10.2 % bezogen auf zwei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 0.33 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua4}: [C₈₄H₁₂₃N₄₉O₂₈]; M_{Gua2}: [C₈₂H₁₁₉N₄₅O₂₈]; M_{Gua1}: [C₈₁H₁₁₇N₄₃O₂₈] m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 756.1, gef. 754.1; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 728.3, gef. 729.9. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua2}+H]⁺ 2181.9267, gef. 2183.5991; m/z für [M_{Gua1}+H]⁺ 2139.9049, gef. 2143.0700.

AcNH[Pra-Neo(Gua)₃]GGagag^{CONH₂} **PPO-gA29**

1.51 mg (0.44 µmol, 10.0 % bezogen auf drei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 0.34 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua4}: [C₈₂H₁₂₀N₄₈O₂₇]; M_{Gua3}: [C₈₁H₁₁₈N₄₆O₂₇]; M_{Gua2}: [C₈₀H₁₁₆N₄₄O₂₇]; M_{Gua1}: [C₇₉H₁₁₄N₄₂O₂₇] m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 737.3, gef. 737.8; m/z für [M_{Gua3}+3H]³⁺ 723.3, gef. 723.5; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 709.3, gef. 709.9; m/z für [M_{Gua1}+3H]³⁺ 695.2, gef. 695.3. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua4}+H]⁺ 2209.9562, gef. 2209.5879; m/z für [M_{Gua3}+H]⁺ 2167.9344, gef. 2165.1993; m/z für [M_{Gua2}+H]⁺ 2125.9126, gef. 2128.4262.

AcNHCY[Pra-Neo(Gua)₄]PC^{CONH₂} **cP-gA30**

0.4 mg (0.18 µmol, 1.0 % bezogen auf vier Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.50 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua5}: [C₆₄H₉₇N₂₇O₂₂S₂]; M_{Gua4}: [C₆₃H₉₅N₂₅O₂₂S₂]; M_{Gua2}: [C₆₁H₉₁N₂₁O₂₂S₂] m/z für [M_{Gua5}+3H]³⁺ 554.2, gef. 554.8; m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 540.2, gef. 540.8; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 512.2, gef. 512.2 | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua5}+Na]⁺ 1682.6631, gef. 1679.8689; m/z für [M_{Gua4}+Na]⁺ 1640.6413, gef. 1638.8887; m/z für [M_{Gua2}+Na]⁺ 1556.5977, gef. 1555.4959.

Allgemeine Vorschrift für Guanidinylierung an zyklischen Peptid-Aminoglykosid-Konjugaten:

Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus acetyliert. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss daran wurde an fester Phase erst zyklisiert, danach nach oben beschriebenem Protokoll die CuAAC durchgeführt und schließlich die Guanidinylierung an fester Phase durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das Peptid vom Harz freigesetzt und das Rohprodukt mit Hilfe der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Das Peptid wurde nach anschließendem Lyophilisieren erhalten.

AcNH-C[CHRIS[Pra-Neo(Gua)₃]Y-C^{CONH₂} cP-gA31

0.24 mg (0.09 µmol, 1.8 % bezogen auf drei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.70 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua5} : [C₈₀H₁₂₅N₃₅O₂₆S₂]; M_{Gua4} : [C₇₉H₁₂₃N₃₃O₂₆S₂]; M_{Gua3} : [C₇₈H₁₂₁N₃₁O₂₆S₂] m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 672.2, gef. 672.3; m/z für [M_{Gua3}+3H]³⁺ 658.2, gef. 658.2. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua5}+H]⁺ 2056.9045, gef. 2053.4526.

AcNH-C[Pra-Neo(Gua)₂]YTSC^{CONH₂} cP-gA32

0.16 mg (0.07 µmol, 1.1 % bezogen auf zwei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.50 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua3} : [C₆₄H₉₈N₂₄O₂₅S₂]; M_{Gua2} : [C₆₃H₉₆N₂₂O₂₅S₂]; M_{Gua1} : [C₆₂H₉₄N₂₀O₂₅S₂] m/z für [M_{Gua3}+3H]³⁺ 556.6, gef. 558.4; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 542.5, gef. 542.8; m/z für [M_{Gua1}+3H]³⁺ 528.5, gef. 529.3. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua4}+H]⁺ 1667.6645, gef. 1662.6968; m/z für [M_{Gua3}+H]⁺ 1625.6427, gef. 1619.9416; m/z für [M_{Gua2}+H]⁺ 1583.6209, gef. 1578.9307.

Allgemeine Vorschrift für die Guanidinylierung FAM-markierter Konjugate:

Die Guanidinylierung wurde gemäß dem oben beschriebenen Protokoll an den Peptiden durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das Peptid vom Harz freigesetzt und das Rohprodukt mit Hilfe der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Das Peptid wurde nach anschließendem Lyophilisieren erhalten.

FAMNH[Pra-Nea(Gua)₂₋₃]LVA^{CONH₂} P-gA33

0.59 mg (0.42 µmol, 2.5 % bezogen auf zwei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.71 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua3} : [C₅₅H₇₃N₁₇O₁₆]; M_{Gua2} : [C₅₄H₇₁N₁₅O₁₆] m/z für [M_{Gua3}+3H]³⁺ 614.7, gef. 615.2; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 593.7, gef. 594.1; m/z für [M_{Gua3}+4H]⁴⁺ 410.1, gef. 410.4. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua3}+H]⁺ 1227.5419, gef. 1229.1298; m/z für [M_{Gua2}+H]⁺ 1185.5201, gef. 1185.8527.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₂₋₄]^{CONH₂} **P-gA34**

1.66 mg (0.89 µmol, 4.8 % bezogen auf drei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.61 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua4} : [C₆₇H₉₅N₂₆O₂₃]; M_{Gua3} : [C₆₆H₉₃N₂₄O₂₃]; M_{Gua2} : [C₆₅H₉₃N₂₂O₂₃] m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 521.5, gef. 522.0; m/z für [M_{Gua3}+3H]³⁺ 507.6, gef. 507.6; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 493.5, gef. 493.9. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua4}+H]⁺ 1562.6981, gef. 1545.3358; m/z für [M_{Gua3}+H]⁺ 1520.6763, gef. 1503.4823; m/z für [M_{Gua2}+H]⁺ 1478.6545, gef. 1461.7456.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₄]^{CONH₂} **PPO-gA35**

2.56 mg (0.86 µmol, 21.5 % bezogen auf vier Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.30 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua4} : [C₁₀₁H₁₂₈N₄₈O₃₂] m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 842.6, gef. 843.1; m/z für [M_{Gua4}+4H]⁴⁺ 632.2, gef. 632.4. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua4}+H]⁺ 2525.9934, gef. 2532.0094.

FAMNH^{agag}GG[Pra-Neo(Gua)₃]^{CONH₂} **PPO-gA36**

0.4 mg (0.11 µmol, 5.3 % bezogen auf drei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.58 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua4} : [C₁₀₃H₁₃₁N₄₉O₃₃]; M_{Gua3} : [C₁₀₂H₁₂₉N₄₇O₃₃]; M_{Gua2} : [C₁₀₁H₁₂₇N₄₅O₃₃] m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 861.7, gef. 862.6; m/z für [M_{Gua3}+3H]³⁺ 847.6, gef. 847.6; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 833.6, gef. 834.4. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua3}+H]⁺ 2540.9930, gef. 2537.0439; m/z für [M_{Gua2}+H]⁺ 2498.9712, gef. 2493.0477.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₂₋₅]^{CONH₂} **PPO-gA37**

0.8 mg (0.25 µmol, 5.8 % bezogen auf drei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.33 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua5} : [C₁₀₀H₁₃₁N₄₃O₃₄]; M_{Gua4} : [C₉₉H₁₂₉N₄₁O₃₄]; M_{Gua3} : [C₉₈H₁₂₇N₃₉O₃₄]; M_{Gua2} : [C₉₇H₁₂₅N₃₇O₃₄] m/z für [M_{Gua5}+3H]³⁺ 827.0, gef. 827.2; m/z für [M_{Gua4}+3H]³⁺ 812.9, gef. 813.5; m/z für [M_{Gua3}+3H]³⁺ 798.9, gef. 799.2; m/z für [M_{Gua2}+3H]³⁺ 784.9, gef. 785.5. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua4}+H]⁺ 2436.9695, gef. 2435.9621; m/z für [M_{Gua3}+H]⁺ 2394.9477, gef. 2393.7193.

FAMNH^{tcac}GG[Pra-Neo(Gua)₃]^{CONH₂} **PPO-gA38**

0.73 mg (0.20 µmol, 9.9 % bezogen auf drei Guanidineinheiten) | UPLC-MS: t_R = 1.56 und 1.88 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{Gua5} : [C₁₀₂H₁₃₄N₄₄O₃₅]; M_{Gua3} : [C₁₀₀H₁₃₀N₄₀O₃₅]; M_{Gua2} : [C₉₉H₁₂₈N₃₈O₃₅]; M_{Gua1} : [C₉₈H₁₂₆N₃₆O₃₅] m/z für [M_{Gua5}+3H+Na+TFA]⁴⁺ 668.7, gef. 668.7; m/z für [M_{Gua3}+3H+Na+TFA]⁴⁺ 647.7, gef. 646.9; m/z für [M_{Gua1}+3H+Na+TFA]⁴⁺ 626.7, gef. 626.1. | MALDI-TOF: m/z für [M_{Gua2}+H]⁺ 2409.9473, gef. 2409.5089.

Allgemeine Vorschrift für die CuAAC mit 3-Azido-boc-guanidinoemycin: Das Peptid wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen SPPS synthetisiert. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Gruppe demaskiert und der N-Terminus nach Vorschrift mit

5(6)-Carboxyfluorescein gekuppelt. Es erfolgte die Bestimmung der Umsatzrate und eine Testspaltung. Im Anschluss daran wurde an fester Phase nach oben beschriebenem Protokoll die CuAAC durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das Peptid vom Harz freigesetzt und das Rohprodukt mit Hilfe der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Das Peptid wurde nach anschließendem Lyophilisieren erhalten.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₅]LVA^{CONH2} **PPO-gA39**

2.89 mg (1.32 µmol, 13.7 %, verunreinigt mit dem Neaminderivat) | UPLC-MS: t_R = 1.70 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $M_{NeoGua5}$: [C₆₈H₉₇N₂₃O₂₃]; $M_{NeaGua3}$: [C₅₅H₇₃N₁₇O₁₆] m/z für [M_{NeoGua5}+2H+2TFA]²⁺ 916.8, gef. 917.1; m/z für [M_{NeoGua5}+2H+TFA]²⁺ 859.8, gef. 860.6; m/z für [M_{NeoGua5}+2H]²⁺ 802.8, gef. 803.7; m/z für [M_{NeoGua5}+3H]³⁺ 535.5, gef. 536.0. | MALDI-TOF: m/z für [M_{NeoGua5}+H]⁺ 1604.7199, gef. 1601.0642; m/z für [M_{NeaGua3}+H]⁺ 1228.5492, gef. 1224.8121.

FAMNH[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]CHRISY^{CONH2} **P-gA40**

0.85 mg (0.29 µmol, 4.3 % bezogen auf das Neaminderivat) | UPLC-MS: t_R = 1.67 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $M_{NeoGua5}$: [C₉₀H₁₂₆N₃₂O₃₀S]; $M_{NeaGua3}$: [C₇₇H₁₀₂N₂₆O₂₃S] m/z für [M_{NeaGua3}+2H]²⁺ 896.3, gef. 896.2. | MALDI-TOF: m/z für [M_{NeoGua5}+H]⁺ 2167.9108, gef. 2168.1214; m/z für [M_{NeaGua3}+H]⁺ 1791.7401, gef. 1792.9712.

FAMNH[C][Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]YTSC^{CONH2} **P-gA41**

0.22 mg (0.11 µmol, 1.6 % bezogen auf das Neaminderivat) | UPLC-MS: t_R = 0.33 und 1.87 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $M_{NeoGua5}$: [C₈₅H₁₁₀N₂₈O₃₀S₂]; $M_{NeaGua3}$: [C₇₂H₈₆N₂₂O₂₃S₂] m/z für [M_{NeaGua3}+2H]²⁺ 846.4, gef. 846.8; m/z für [M_{NeoGua5}+3H]³⁺ 689.9, gef. 690.3; m/z für [M_{NeaGua3}+3H]³⁺ 564.6, gef. 564.9. | MALDI-TOF: m/z für [M_{NeoGua5}+H]⁺ 2067.7453, gef. 2071.0326; m/z für [M_{NeaGua3}+H]⁺ 1691.8090, gef. 1697.6218.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₅]GGagag^{CONH2} **PPO-gA42**

2.3 mg (0.73 µmol, 21.5 %) | UPLC-MS: t_R = 1.29 min (3 – 40 % B in 2.5 min), [C₁₀₀H₁₃₀N₅₀O₃₂] m/z für [M+3H+TFA]³⁺ 894.6, gef. 895.4; m/z für [M+3H]³⁺ 856.6, gef. 856.9; m/z für [M+4H]⁴⁺ 642.7, gef. 643.2. | MALDI-TOF: m/z für [M+H]⁺ 2568.0152, gef. 2567.4378.

FAMNHagagGG[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]G^{CONH2} **PPO-gA43**

0.28 mg (0.09 µmol, 8.6 % bezogen auf das Neaminderivat) | UPLC-MS: t_R = 1.53 min (3 – 40 % B in 2.5 min), $M_{NeoGua5}$: [C₁₀₄H₁₃₃N₅₁O₃₃]; $M_{NeaGua3}$: [C₉₁H₁₀₉N₄₅O₂₆] m/z für [M_{NeaGua3}+2H]²⁺ 1124.9, gef. 1124.9; m/z für [M_{NeoGua5}+3H]³⁺ 875.6, gef. 876.2; m/z für

$[M_{\text{NeoGua3}}+3H]^{3+}$ 750.2, gef. 750.5. | MALDI-TOF: m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+H]^+$ 2624.0293, gef. 2627.1442; m/z für $[M_{\text{NeoGua3}}+H]^+$ 2248.8659, gef. 2246.4080.

FAMNH[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]GGtcac^{CONH2} **PPO-gA44**

2.66 mg (0.76 µmol, 15.5 % verunreinigt mit entsprechendem Neaminderivat) | UPLC-MS: t_R = 1.31 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{NeoGua5} : $[C_{100}H_{131}N_{43}O_{34}]$; M_{NeoGua3} : $[C_{87}H_{107}N_{37}O_{27}]$; m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+3H+TFA]^{3+}$ 864.9, gef. 865.5; m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+3H]^{3+}$ 827.0, gef. 827.5; m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+4H]^{4+}$ 620.5, gef. 621.5; m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+5H]^{5+}$ 496.8, gef. 497.0. | MALDI-TOF: m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+H]^+$ 2478.9913, gef. 2474.9713 und m/z für $[M_{\text{NeoGua3}}+H]^+$ 2102.8206, gef. 2100.6196.

FAMNH_ttcacGG[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]G^{CONH2} **PPO-gA45**

0.2 mg (0.06 µmol, 6.3 % bezogen auf das Neaminderivat) | UPLC-MS: t_R = 1.45 min (3 – 40 % B in 2.5 min), M_{NeoGua5} : $[C_{102}H_{134}N_{44}O_{35}]$; M_{NeoGua3} : $[C_{89}H_{110}N_{38}O_{28}]$ m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+3H]^{3+}$ 846.0, gef. 846.5; m/z für $[M_{\text{NeoGua3}}+3H]^{3+}$ 720.6, gef. 720.8. | MALDI-TOF: m/z für $[M_{\text{NeoGua5}}+H]^+$ 2536.0127, gef. 2539.4373; m/z für $[M_{\text{NeoGua3}}+H]^+$ 2158.8347, gef. 2156.9454.

FmocNHGGGS-Pra-G^{Rink-Amid-PEG-Harz}/FmocNHGGGS-Pra-G^{CONH2} **Spacer**

Die Vorfunktionalisierung des Harzes erfolgte nach allgemeiner Vorschrift der *SPPS*. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde eine Testspaltung durchgeführt.

UPLC-MS: t_R = 4.12 min (3 – 60 % B in 6 min), $[C_{31}H_{35}N_7O_9]$ m/z für $[M+H]^+$ 650.2, gef. 650.2.

Allgemeine Vorschrift für die Peptide mit Hilfe automatisierter SPPS: Das Peptid wurde ausgehend vom vorfunktionalisierten Harz mit Hilfe der automatisierten *SPPS* synthetisiert. Im Anschluss folgte die *CuAAC* gemäß dem oben beschriebenen Protokoll. Die terminale Fmoc Gruppe wurde entfernt, das Peptid vom Harz freigesetzt und das Rohprodukt mit Hilfe der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Das Peptid wurde nach anschließendem Lyophilisieren erhalten.

H₂N^YHDPNRKCCYAAGGGS[Pra(Fam-N₃)]G^{CONH2} **P46**

0.910 mmol/L (0.1 mL, 1.8 %). | UPLC-MS: t_R = 1.96 min (3 – 80 % B in 4 min), $[C_{104}H_{136}N_{30}O_{32}S_2]$ m/z für $[M+2H]^{2+}$ 1191.4, gef. 1190.9; m/z für $[M+3H]^{3+}$ 794.6, gef. 794.7. | MALDI-TOF: m/z für $[M+H]^+$ 2381.9433, gef. 2389.5037.

^{H2N}KCCYSAPVETAMGGGS[Pra(Fam-N₃)]G^{CONH2} **P47**

3.23 mmol/L (0.1 mL, 6.5 %). | UPLC-MS: t_R = 2.14 min (3 – 80 % B in 4 min), [C₉₇H₁₃₄N₂₄O₃₂S₃] m/z für [M+2H]²⁺ 1122.4, gef. 1121.9; m/z für [M+3H]³⁺ 748.6, gef. 748.5. | MALDI-TOF: m/z für [M+H]⁺ 2243.8822, gef. 2240.0515.

^{H2N}KVVTVDWLLLQRGGGS[Pra(Fam-N₃)]G^{CONH2} **P48**

1.50 mmol/L (0.1 mL, 3 %) | UPLC-MS: t_R = 2.41 min (3 – 80 % B in 4 min), [C₁₂₇H₁₆₃N₂₉O₃₁] m/z für [M+2H]²⁺ 1206.1, gef. 1206.8; m/z für [M+3H]³⁺ 804.4, gef. 804.9. | MALDI-TOF: m/z für [M+H]⁺ 2411.2134, gef. 2410.5774.

^{H2N}KVWVIPSNFTAFGGGS[Pra(Fam-N₃)]G^{CONH2} **P49**

2.48 mmol/L (0.1 mL, 5 %). | UPLC-MS: t_R = 2.53 min (3 – 80 % B in 4 min), [C₁₁₃H₁₄₈N₂₆O₃₀] m/z für [M+2H]²⁺ 1175.5, gef. 1176.2; m/z für [M+3H]³⁺ 784.0, gef. 784.6. | MALDI-TOF: m/z für [M+H]⁺ 2350.091, gef. 2350.5294.

^{H2N}DPILPKKLWIVKGGGS[Pra(Fam-N₃)]G^{CONH2} **P50**

3.06 mmol/L (0.1 mL, 6.1 %). | UPLC-MS: t_R = 2.29 min (3 – 80 % B in 4 min), [C₁₁₅H₁₆₇N₂₇O₂₉] m/z für [M+2H]²⁺ 1196.1, gef. 1196.8; m/z für [M+3H]³⁺ 797.7, gef. 798.3; m/z für [M+4H]⁴⁺ 598.5, gef. 599.0. | MALDI-TOF: m/z für [M+H]⁺ 2391.2486, gef. 2394.4711.

6 Literatur

- [1] A. Rodriguez, S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst, A. Bradley, *Genome Research* **2004**, *14*, 1902-1910.
- [2] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim, *EMBO J* **2004**, *23*, 4051-4060.
- [3] X. CAI, C. H. HAGEDORN, B. R. CULLEN, *RNA* **2004**, *10*, 1957-1966.
- [4] aJ. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin, V. N. Kim, *Genes Dev* **2004**, *18*, 3016-3027; bY. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V. N. Kim, *Nature* **2003**, *425*, 415-419.
- [5] aR. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen, *Genes Dev* **2003**, *17*, 3011-3016; bE. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, U. Kutay, *Science* **2004**, *303*, 95-98.
- [6] aE. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* **2001**, *409*, 363-366; bE. LUND, J. E. DAHLBERG, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **2006**, *71*, 59-66.
- [7] J.-E. Park, I. Heo, Y. Tian, D. K. Simanshu, H. Chang, D. Jee, D. J. Patel, V. N. Kim, *Nature* **2011**, *475*, 201-205.
- [8] A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell*, *115*, 209-216.
- [9] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* **2003**, *115*, 199-208.
- [10] G. Hutvagner, M. J. Simard, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9*, 22-32.
- [11] aA. J. Pratt, I. J. MacRae, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 17897-17901; bV. N. Kim, J. Han, M. C. Siomi, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10*, 126-139.
- [12] A. Eulalio, E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser, E. Izaurralde, *RNA* **2009**, *15*, 21-32.
- [13] al. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, Z. Bentwich, *Nat Genet* **2005**, *37*, 766-770; bR. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Genome Research* **2009**, *19*, 92-105; cB. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Cell* **2005**, *120*, 15-20.
- [14] A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, *Nucleic Acids Research* **2011**, *39*, D152-D157.
- [15] aL. He, G. J. Hannon, *Nat Rev Genet* **2004**, *5*, 522-531; bC. M. Croce, G. A. Calin, *Cell* **2005**, *122*, 6-7.
- [16] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, C. M. Croce, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 15524-15529.
- [17] H. Döhner, S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Kröber, L. Bullinger, K. Döhner, M. Bentz, P. Lichter *New England Journal of Medicine* **2000**, *343*, 1910-1916.
- [18] A. Cimmino, G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-g. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, C. M. Croce, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 13944-13949.
- [19] G. A. Calin, C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini, C. M. Croce, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 2999-3004.
- [20] B. Zhang, X. Pan, G. P. Cobb, T. A. Anderson, *Developmental Biology* **2007**, *302*, 1-12.
- [21] J. Takamizawa, H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, T. Takahashi, *Cancer Research* **2004**, *64*, 3753-3756.
- [22] M. V. Iorio, M. Ferracin, C.-G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Ménard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, C. M. Croce, *Cancer Research* **2005**, *65*, 7065-7070.

- [23] S. Li, Z. Liang, L. Xu, F. Zou, *Molecular and Cellular Biochemistry* **2012**, 360, 147-158.
- [24] P. P. Medina, M. Nolde, F. J. Slack, *Nature* **2010**, 467, 86-90.
- [25] S. Bicker, G. Schratt, *J Cell Mol Med* **2008**, 12, 1466-1476.
- [26] D. O. Perkins, C. D. Jeffries, L. F. Jarskog, J. M. Thomson, K. Woods, M. A. Newman, J. S. Parker, J. Jin, S. M. Hammond, *Genome Biology* **2007**, 8, 1-11.
- [27] T. Thum, C. Gross, J. Fiedler, T. Fischer, S. Kissler, M. Bussen, P. Galuppo, S. Just, W. Rottbauer, S. Frantz, M. Castoldi, J. Soutschek, V. Koteliensky, A. Rosenwald, M. A. Basson, J. D. Licht, J. T. R. Pena, S. H. Rouhanifard, M. U. Muckenthaler, T. Tuschl, G. R. Martin, J. Bauersachs, S. Engelhardt, *Nature* **2008**, 456, 980-984.
- [28] C. Schöniger, C. Arenz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 6115-6118.
- [29] J. Weiler, J. Hunziker, J. Hall, *Gene Ther* **2005**, 13, 496-502.
- [30] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, 391, 806-811.
- [31] John C. Burnett, John J. Rossi, *Chemistry & Biology* **2012**, 19, 60-71.
- [32] G. Hutvágner, M. J. Simard, C. C. Mello, P. D. Zamore, *PLoS Biol* **2004**, 2, e98.
- [33] G. MEISTER, M. LANDTHALER, Y. DORSETT, T. TUSCHL, *RNA* **2004**, 10, 544-550.
- [34] C. M. Connelly, R. Uprety, J. Hemphill, A. Deiters, *Molecular BioSystems* **2012**, 8, 2987-2993.
- [35] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
- [36] M. M. Fabani, M. J. Gait, *RNA* **2008**, 14, 336-346.
- [37] aA. G. Torres, R. N. Threlfall, M. J. Gait, *Artificial DNA: PNA & XNA* **2011**, 2, 71-78; bA. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, D. Williams, N. Al-Obaidi, F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, O. Seitz, M. J. Gait, *Nucleic Acids Research* **2012**, 40, 2152-2167.
- [38] aM. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chemical Reviews* **2007**, 107, 3715-3743; bG. Mayer, *Angewandte Chemie* **2009**, 121, 2710-2727.
- [39] C. E. Lünse, G. Michlewski, C. S. Hopp, A. Rentmeister, J. F. Cáceres, M. Famulok, G. Mayer, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 4674-4677.
- [40] J. Liz, A. Portela, M. Soler, A. Gómez, H. Ling, G. Michlewski, George A. Calin, S. Guil, M. Esteller, *Molecular Cell* **2014**, 55, 138-147.
- [41] aA. Deiters, *The AAPS Journal* **2010**, 12, 51-60; bS. Zhang, L. Chen, E. J. Jung, G. A. Calin, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2010**, 87, 754-758.
- [42] G. Shan, Y. Li, J. Zhang, W. Li, K. E. Szulwach, R. Duan, M. A. Faghihi, A. M. Khalil, L. Lu, Z. Paroo, A. W. S. Chan, Z. Shi, Q. Liu, C. Wahlestedt, C. He, P. Jin, *Nat Biotech* **2008**, 26, 933-940.
- [43] Y.-L. Chiu, C. U. Dinesh, C.-y. Chu, A. Ali, K. M. Brown, H. Cao, T. M. Rana, *Chemistry & Biology* **2005**, 12, 643-648.
- [44] K. Gumireddy, D. D. Young, X. Xiong, J. B. Hogenesch, Q. Huang, A. Deiters, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, 47, 7482-7484.
- [45] Y. Naro, M. Thomas, M. D. Stephens, C. M. Connelly, A. Deiters, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25, 4793-4796.
- [46] M.-P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, P. M. Tulkens, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, 43, 727-737.
- [47] B. François, R. J. M. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens, E. Westhof, *Nucleic Acids Research* **2005**, 33, 5677-5690.
- [48] H. Wang, Y. Tor, *Angewandte Chemie* **1998**, 110, 117-120.
- [49] K. Michael, H. Wang, Y. Tor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, 7, 1361-1371.
- [50] J. B. H. Tok, J. Cho, R. R. Rando, *Biochemistry* **1999**, 38, 199-206.
- [51] aG. Varani, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1995**, 24, 379-404; bX. Liu, J. R. Thomas, P. J. Hergenrother, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 9196-9197.
- [52] J. R. Thomas, X. Liu, P. J. Hergenrother, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 12434-12435.
- [53] aB. P. Davies, C. Arenz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, 45, 5550-5552; bB. P. Davies, C. Arenz, *Bioorg Med Chem* **2008**, 16, 49-55.
- [54] C. M. Klemm, A. Berthelmann, S. Neubacher, C. Arenz, *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 2009, 2788-2794.

- [55] S. Neubacher, C. M. Dojahn, C. Arenz, *Chembiochem* **2011**, 12, 2302-2305.
- [56] aD. D. Vo, C. Staedel, L. Zehnacker, R. Benhida, F. Darfeuille, M. Duca, *ACS Chemical Biology* **2014**, 9, 711-721; bD. D. Vo, T. P. A. Tran, C. Staedel, R. Benhida, F. Darfeuille, A. Di Giorgio, M. Duca, *Chemistry – A European Journal* **2016**, 22, 5350-5362.
- [57] D. Guianvarc'h, R. Benhida, J.-L. Fourrey, R. Maurisse, J.-S. Sun, *Chemical Communications* **2001**, 1814-1815.
- [58] D. Bose, G. Jayaraj, H. Suryawanshi, P. Agarwala, S. K. Pore, R. Banerjee, S. Maiti, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 1019-1023.
- [59] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154.
- [60] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chemical Reviews* **1990**, 90, 543-584.
- [61] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, 354, 84-86.
- [62] L. A. Carpino, *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, 4427-4431.
- [63] S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, H. Sugihara, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1967**, 40, 2164-2167.
- [64] aL. A. Carpino, G. Y. Han, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92, 5748-5749; bK. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, 3943-3946.
- [65] aP. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron* **1993**, 49, 11065-11133; bJ. A. Moss, in *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [66] aA. El-Faham, F. Albericio, *Chemical Reviews* **2011**, 111, 6557-6602; bT. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *Journal of Saudi Chemical Society* **2012**, 16, 97-116.
- [67] N. Stephanopoulos, M. B. Francis, *Nat Chem Biol* **2011**, 7, 876-884.
- [68] aH. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Accounts of Chemical Research* **2001**, 34, 727-736; bA. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14, 603-609; cL. V. Lee, M. L. Mitchell, S.-J. Huang, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 9588-9589.
- [69] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, 2004-2021.
- [70] aV. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 2596-2599; bC. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 3057-3064.
- [71] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Organic Letters* **2004**, 6, 2853-2855.
- [72] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, 340, 457-460.
- [73] aN. G. Angelo, P. S. Arora, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 17134-17135; bN. G. Angelo, P. S. Arora, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72, 7963-7967.
- [74] H. N. Gopi, K. C. Tirupula, S. Baxter, S. Ajith, I. M. Chaiken, *ChemMedChem* **2006**, 1, 54-57.
- [75] G. Wittig, A. Krebs, *Chemische Berichte* **1961**, 94, 3260-3275.
- [76] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 15046-15047.
- [77] K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 10317-10320.
- [78] F. Abendroth, O. Seitz, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53, 10504-10509.
- [79] T. Posner, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1905**, 38, 646-657.
- [80] A. B. Lowe, *Polymer Chemistry* **2010**, 1, 17-36.
- [81] A. Dondoni, A. Marra, *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, 573-586.
- [82] L. Karmann, U. Kazmaier, *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, 2013, 7101-7109.
- [83] L. Markey, S. Giordani, E. M. Scanlan, *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 4270-4277.

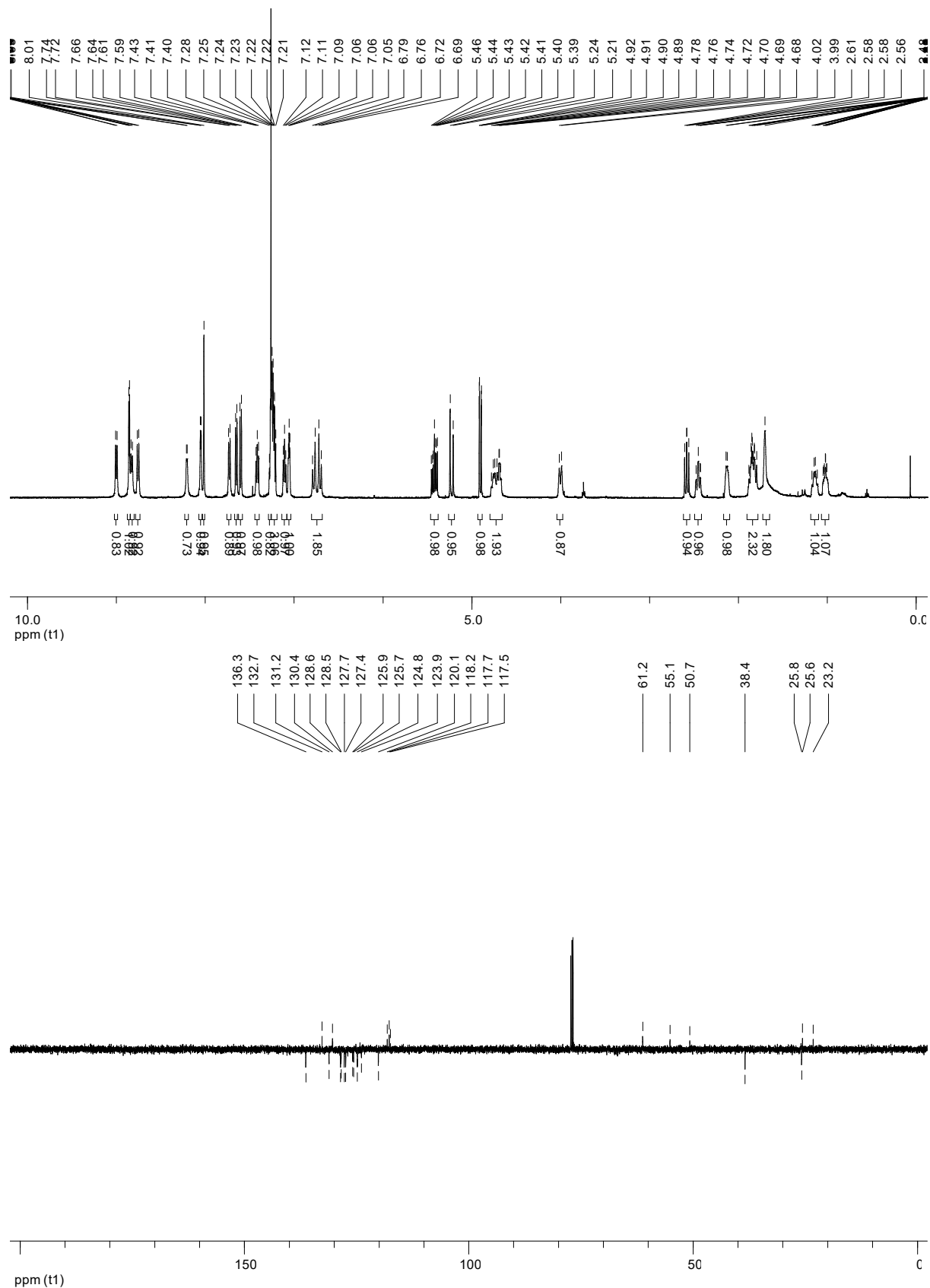
- [84] aF. Wieland, R. Heitzer, W. Schaefer, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1983**, 80, 5470-5474; bS. Shibata, T. Takeda, Y. Natori, *Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 12483-12485; cT. de Beer, J. F. G. Vliegthart, A. Loeffler, J. Hofsteenge, *Biochemistry* **1995**, 34, 11785-11789; dJ. F. G. Vliegthart, F. Casset, *Current Opinion in Structural Biology* **1998**, 8, 565-571.
- [85] H. Kunz, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1987**, 26, 294-308.
- [86] N. Shao, J. Xue, Z. Guo, *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, 9003-9011.
- [87] I. L. Deras, K. Takegawa, A. Kondo, I. Kato, Y. C. Lee, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, 8, 1763-1766.
- [88] B. Mukhopadhyay, S. V. Maurer, N. Rudolph, R. M. van Well, D. A. Russell, R. A. Field, *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 9059-9062.
- [89] S. A. Svarovsky, J. J. Barchi Jr, *Carbohydrate Research* **2003**, 338, 1925-1935.
- [90] S. Manabe, Y. Marui, Y. Ito, *Chemistry – A European Journal* **2003**, 9, 1435-1447.
- [91] B. H. M. Kuijpers, S. Groothuys, A. R. Keereweer, P. J. L. M. Quaedflieg, R. H. Blaauw, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Organic Letters* **2004**, 6, 3123-3126.
- [92] G. F. Gause, Brazhnikova, M. G., *Nature* **1944**, 154.
- [93] aS. H. Joo, *Biomolecules & Therapeutics* **2012**, 20, 19-26; bT. B. Andrew, M. M. Cayla, R. S. Lokey, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2013**, 13, 821-836; cJ. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler, H. Stähelin, *Agents and Actions* **1976**, 6, 468-475; dE. Emanuele, M. Arra, S. Pesenti, *Medical Hypotheses* **2006**, 67, 1250-1251.
- [94] N. Terrett, *MedChemComm* **2013**, 4, 474-475.
- [95] aJ. D. A. Tyndall, T. Nall, D. P. Fairlie, *Chemical Reviews* **2005**, 105, 973-1000; bH. Kessler, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1982**, 21, 512-523; cM. Guharoy, P. Chakrabarti, *Bioinformatics* **2007**, 23, 1909-1918.
- [96] T. Rezai, B. Yu, G. L. Millhauser, M. P. Jacobson, R. S. Lokey, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 2510-2511.
- [97] C. J. White, A. K. Yudin, *Nat Chem* **2011**, 3, 509-524.
- [98] aC. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827-10852; bA. Parenty, X. Moreau, J. M. Campagne, *Chemical Reviews* **2006**, 106, 911-939.
- [99] M. C. Alcaro, G. Sabatino, J. Uziel, M. Chelli, M. Ginanneschi, P. Rovero, A. M. Papini, *Journal of Peptide Science* **2004**, 10, 218-228.
- [100] Lundquist, J. C. Pelletier, *Organic Letters* **2002**, 4, 3219-3221.
- [101] S. J. Miller, H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 9606-9614.
- [102] A. Ravi, P. Balaram, *Tetrahedron* **1984**, 40, 2577-2583.
- [103] aC. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 5891-5892; bY.-W. Kim, T. N. Grossmann, G. L. Verdine, *Nat. Protocols* **2011**, 6, 761-771.
- [104] A. M. Spokorny, Y. Zou, J. J. Ling, H. Yu, Y.-S. Lin, B. L. Pentelute, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135, 5946-5949.
- [105] V. D. Bock, R. Perciaccante, T. P. Jansen, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Organic Letters* **2006**, 8, 919-922.
- [106] R. A. Turner, A. G. Oliver, R. S. Lokey, *Organic Letters* **2007**, 9, 5011-5014.
- [107] M. Roice, I. Johannsen, M. Meldal, *QSAR & Combinatorial Science* **2004**, 23, 662-673.
- [108] A. A. Aimetti, R. K. Shoemaker, C.-C. Lin, K. S. Anseth, *Chemical Communications* **2010**, 46, 4061-4063.
- [109] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 10646-10647.
- [110] aK. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, 354, 82-84; bR. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, 89, 9367-9371; cY.-U. Kwon, T. Kodadek, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 1508-1509.
- [111] S. Chirayil, R. Chirayil, K. J. Luebke, *Nucleic Acids Res* **2009**, 37, 5486-5497.
- [112] A. Rybak, H. Fuchs, L. Smirnova, C. Brandt, E. E. Pohl, R. Nitsch, F. G. Wulczyn, *Nat Cell Biol* **2008**, 10, 987-993.

- [113] K. Moehle, Z. Athanassiou, K. Patora, A. Davidson, G. Varani, J. A. Robinson, *Angewandte Chemie* **2007**, 119, 9260-9264.
- [114] B. D. Gooch, P. A. Beal, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 10603-10610.
- [115] Y. Lee, S. Hyun, H. J. Kim, J. Yu, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, 134-137.
- [116] M. Krishnamurthy, K. Simon, A. M. Orendt, P. A. Beal, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46, 7044-7047.
- [117] K. Feichtinger, H. L. Sings, T. J. Baker, K. Matthews, M. Goodman, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 8432-8439.
- [118] E. Wexselblatt, J. D. Esko, Y. Tor, *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, 79, 6766-6774.
- [119] K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 3804-3805.
- [120] aR. N. De Guzman, R. B. Turner, M. F. Summers, *Biopolymers* **1998**, 48, 181-195; bM. A. Weiss, N. Narayana, *Biopolymers* **1998**, 48, 167-180.
- [121] aA. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, 55, 1189-1193; bM. Green, P. M. Loewenstein, *Cell* **1988**, 55, 1179-1188.
- [122] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 5836-5840.
- [123] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, 91, 664-668.
- [124] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, 97, 13003-13008.
- [125] P. M. Fischer, N. Z. Zhelev, S. Wang, J. E. Melville, R. Fähræus, D. P. Lane, *The Journal of Peptide Research* **2000**, 55, 163-172.
- [126] aM. L. Zapp, S. Stern, M. R. Green, *Cell* **1993**, 74, 969-978; bH.-Y. Mei, A. A. Galan, N. S. Halim, D. P. Mack, D. W. Moreland, K. B. Sanders, N. T. Hoa, A. W. Czarnik, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5, 2755-2760; cH.-Y. Mei, M. Cui, A. Heldsinger, S. M. Lemrow, J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, A. W. Czarnik, *Biochemistry* **1998**, 37, 14204-14212; dS. Wang, P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik, H.-Y. Mei, *Biochemistry* **1998**, 37, 5549-5557.
- [127] N. W. Luedtke, T. J. Baker, M. Goodman, Y. Tor, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 12035-12036.
- [128] N. W. Luedtke, P. Carmichael, Y. Tor, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 12374-12375.
- [129] aW. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet, L. A. Herzenberg, *Review of Scientific Instruments* **1972**, 43, 404-409; bM. H. Julius, T. Masuda, L. A. Herzenberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1972**, 69, 1934-1938.
- [130] L. Elson-Schwab, O. B. Garner, M. Schuksz, B. E. Crawford, J. D. Esko, Y. Tor, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282, 13585-13591.
- [131] A. Litovchick, A. G. Evdokimov, A. Lapidot, *FEBS Letters* **1999**, 445, 73-79.
- [132] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Letters* **2013**, 587, 1693-1702.
- [133] aG. P. H. Dietz, M. Bähr, *Molecular and Cellular Neuroscience* **2004**, 27, 85-131; bM. Mäe, Ü. Langel, *Current Opinion in Pharmacology* **2006**, 6, 509-514.
- [134] C. Schöniger, *Diplomarbeit Humboldt-Universität zu Berlin* **2012**.
- [135] E. J. Corey, F. Xu, M. C. Noe, *J Am Chem Soc* **1997**, 119, 12414-12415.
- [136] H. J. Ressel, Vol. EP1967511A1 (Ed.: E. P. Office), **07.03.2007**.
- [137] M. J. O'Donnell, R. L. Polt, *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, 47, 2663-2666.
- [138] R. J. Brea, M. P. López-Deber, L. Castedo, J. R. Granja, *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 7870-7873.
- [139] H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, 6354-6364.
- [140] A. A. Bastian, E. M. Warszawik, P. Panduru, C. Arenz, A. Herrmann, *Chemistry – A European Journal* **2013**, 19, 9151-9154.
- [141] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Organic Letters* **2007**, 9, 3797-3800.

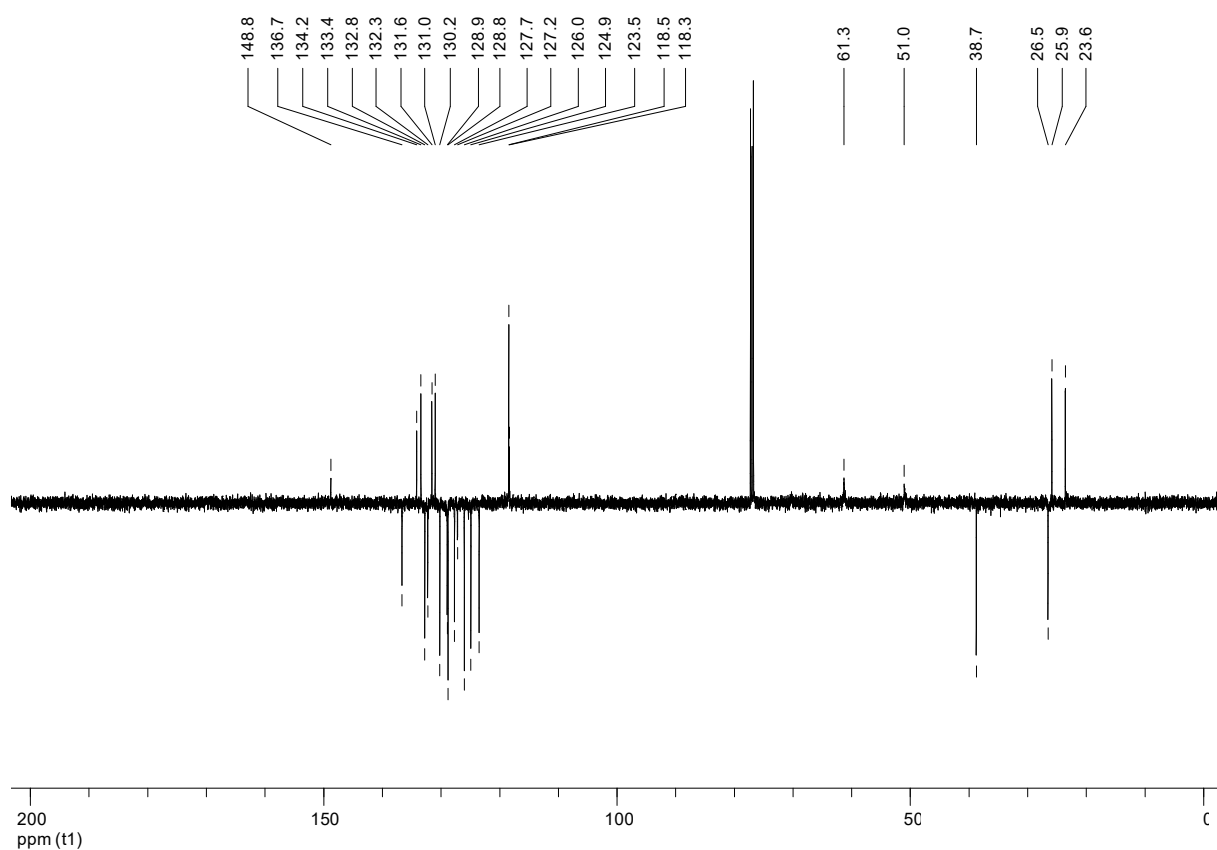
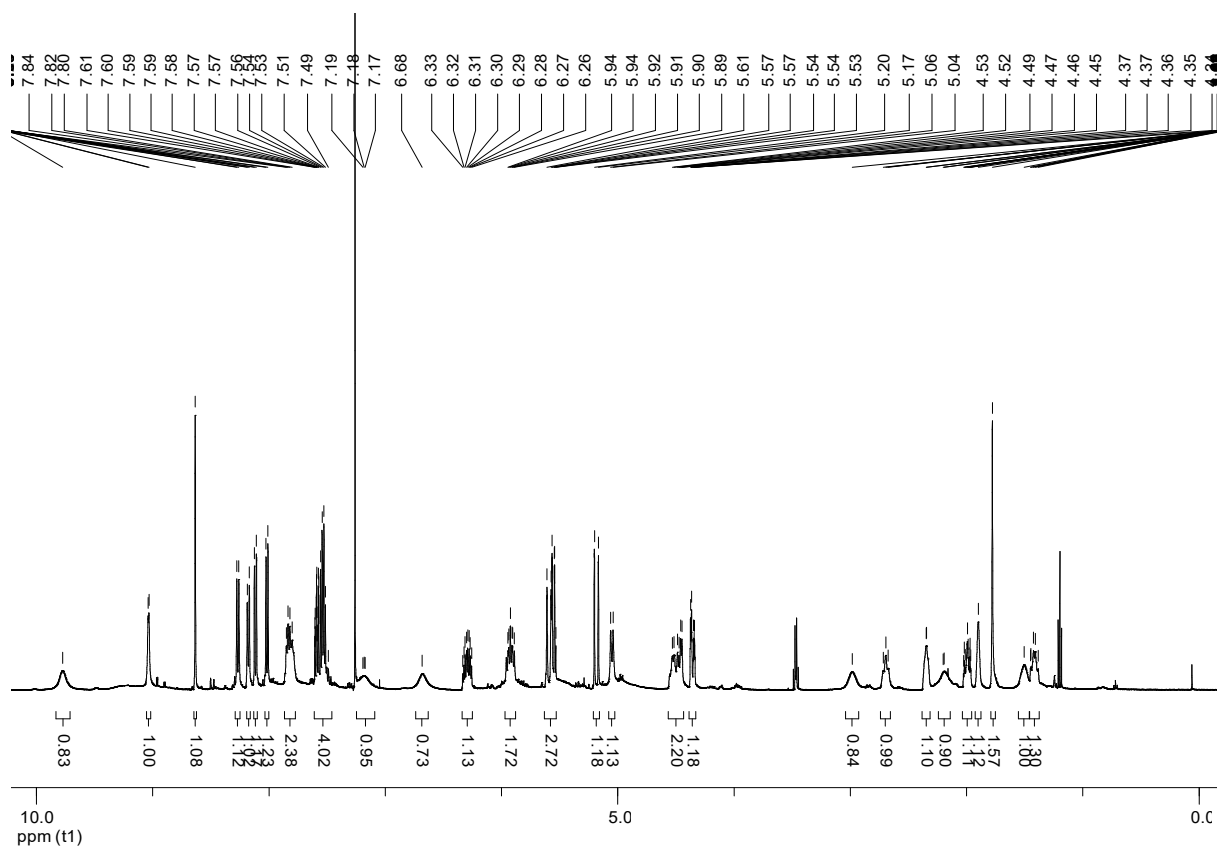
- [142] J. Maury, L. Feray, M. P. Bertrand, A. Kapat, P. Renaud, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9606-9611.
- [143] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 1912-1916.
- [144] P. Timmerman, J. Beld, W. C. Puijk, R. H. Melen, *Chembiochem* **2005**, *6*, 821-824.
- [145] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 2648-2650.
- [146] K. A. Schug, W. Lindner, *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 67-114.
- [147] A. G. Beck-Sickinger, G. Schnorrenberg, J. Metzger, G. Jung, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, *38*, 25-31.
- [148] E. Witkowska, K. Kubik, J. Krosnicka, K. Grabowska, A. Niescioruk, B. Wilenska, A. Misicka, *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 6198-6203.
- [149] M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 2497-2502.
- [150] aE. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595-598; bV. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *Analytical Biochemistry* **1981**, *117*, 147-157.
- [151] aR. Wortmann, A. Hoffmann, R. Haase, U. Flörke, S. Herres-Pawlis, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **2009**, *635*, 64-69; bO. Bienemann, A. Hoffmann, S. Herres-Pawlis, in *Reviews in Inorganic Chemistry*, Vol. 31, **2011**, p. 83.
- [152] M. A. Jongsma, R. H. G. M. Litjens, *PROTEOMICS* **2006**, *6*, 2650-2655.
- [153] C. M. Dojahn, M. Hesse, C. Arenz, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 3128-3130.

Anhang

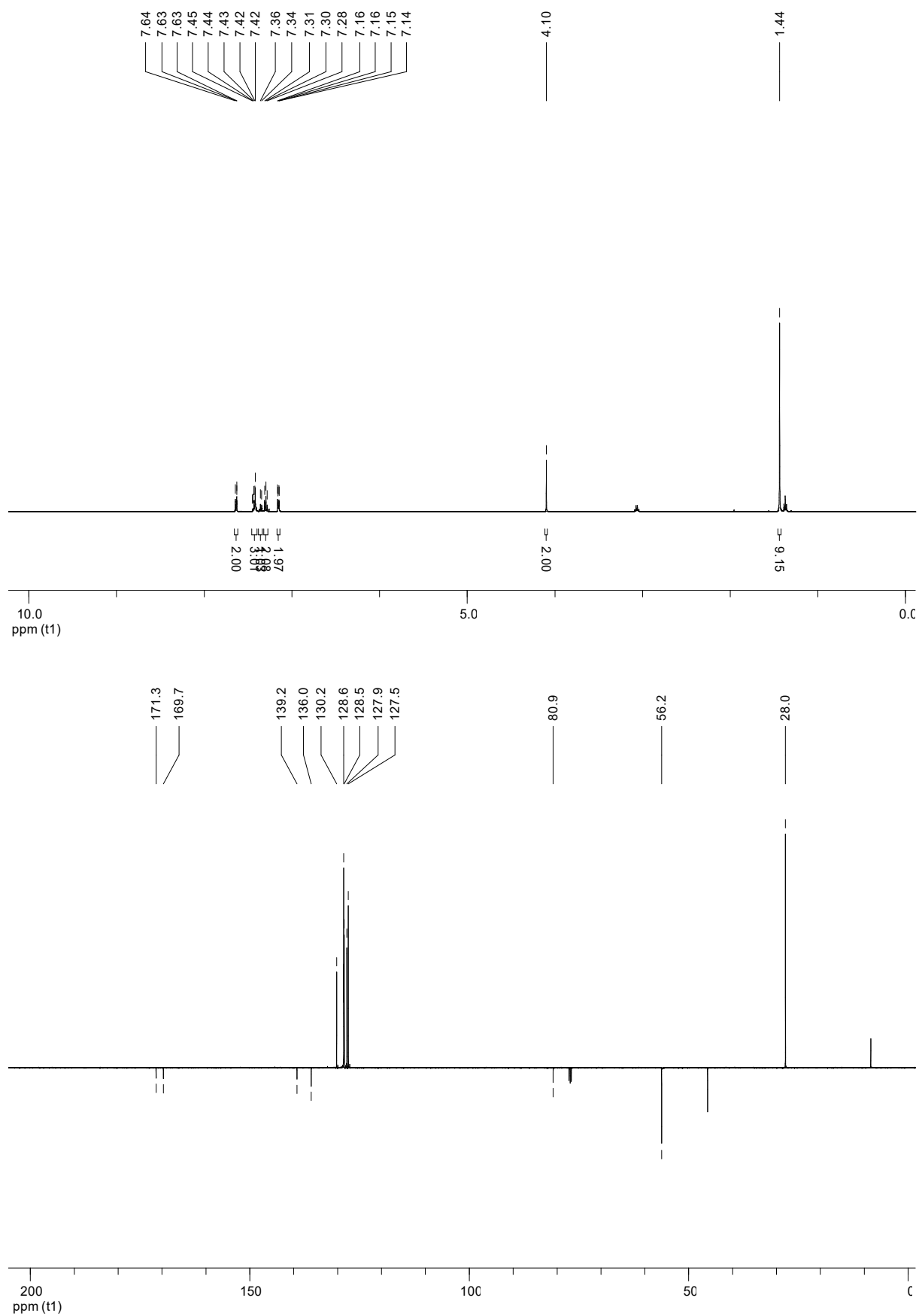
N-9-Anthracylmethylcinchonidinumchlorid (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)



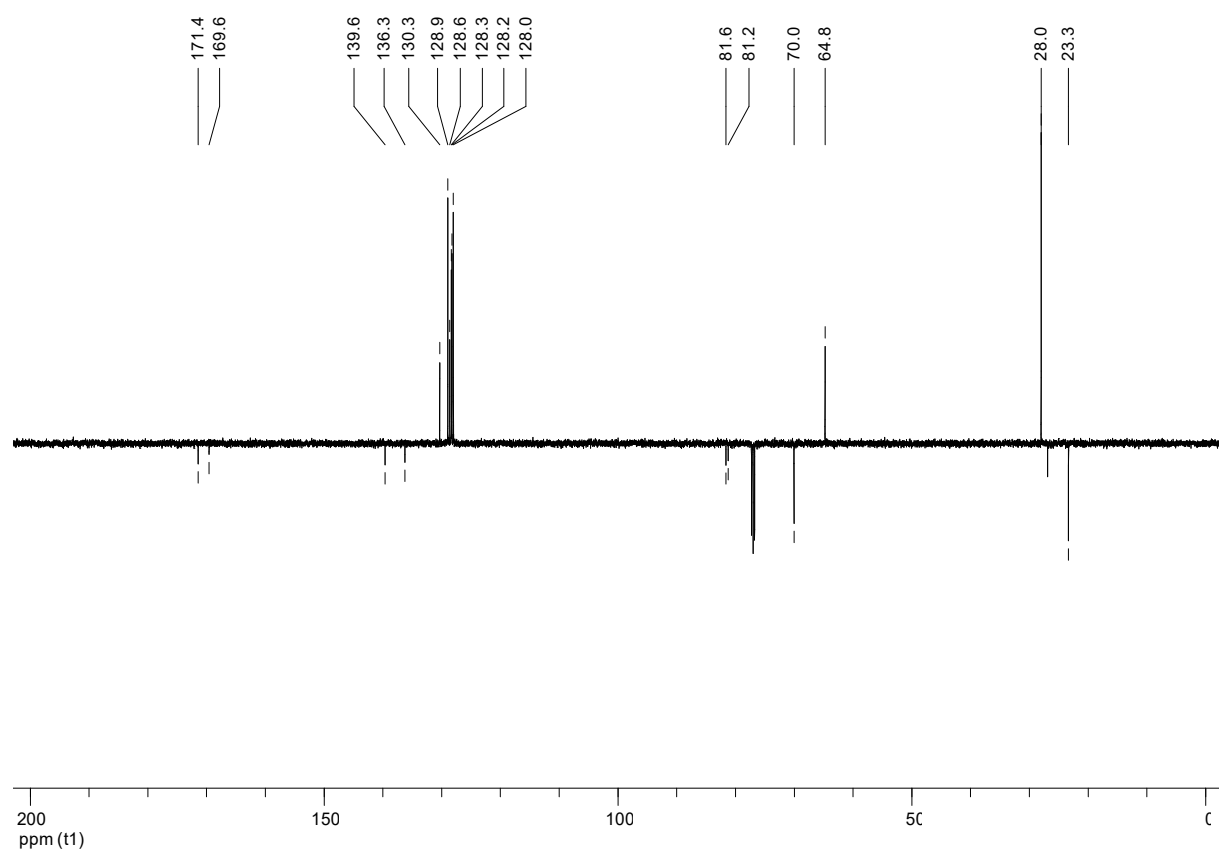
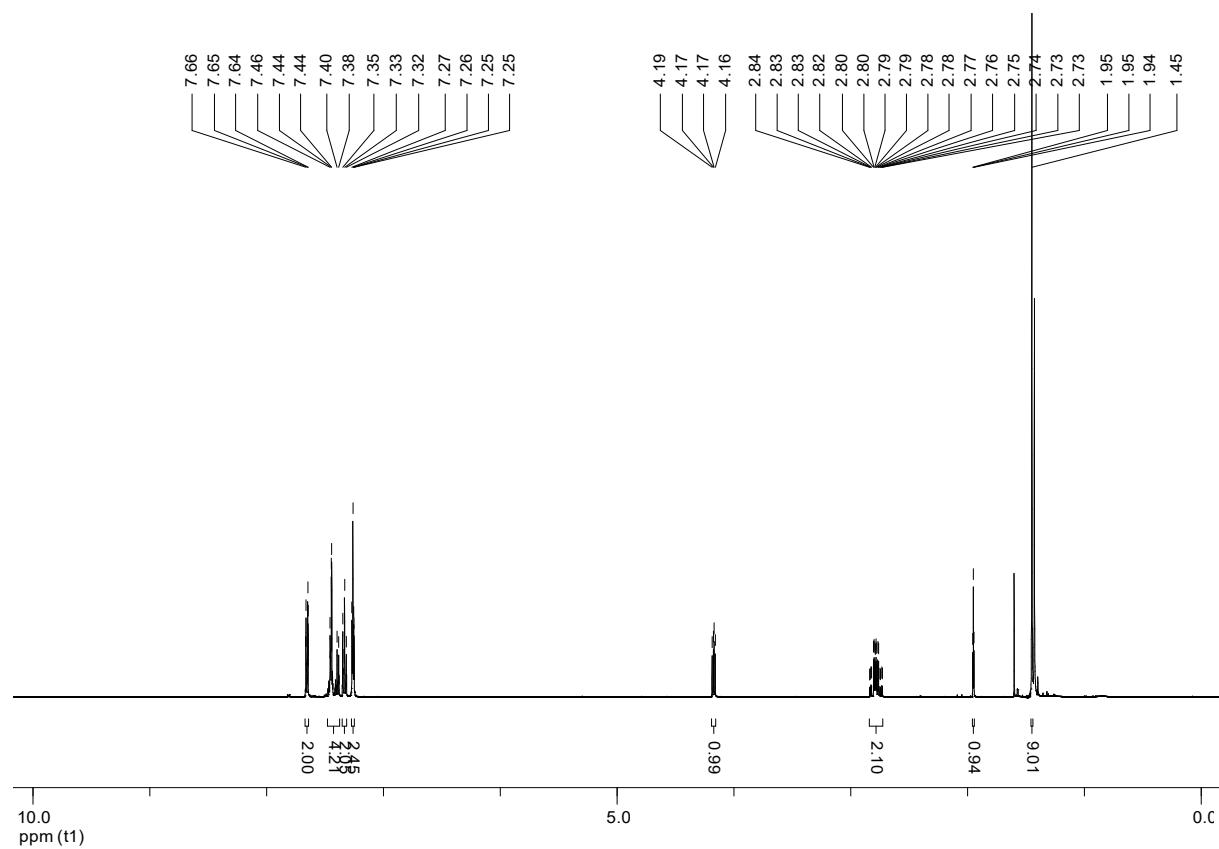
O-(9)-Allyl-N-(9)-anthracylmethylcinchonidinbromid (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

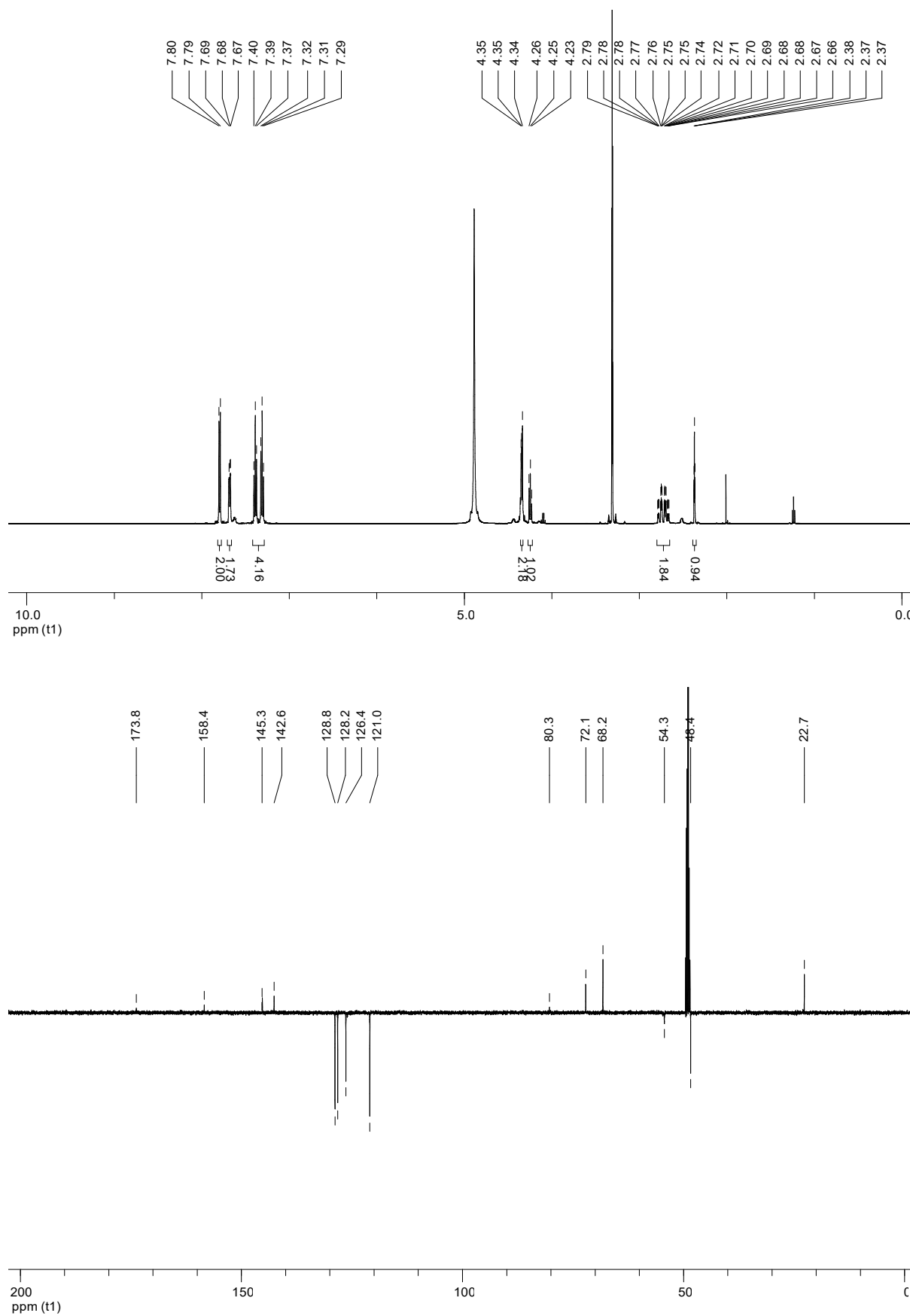


N-Benzophenon-glycin-imin-*tert*-butylester (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

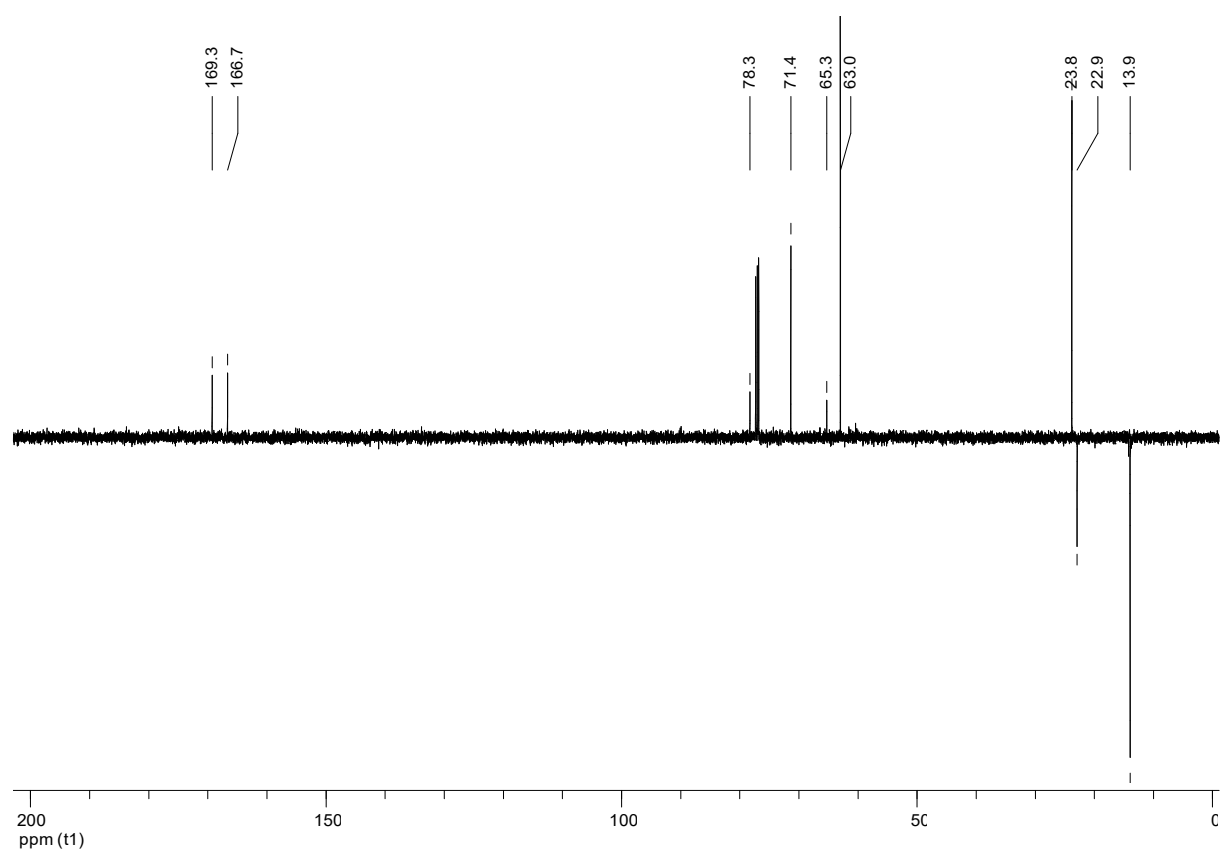
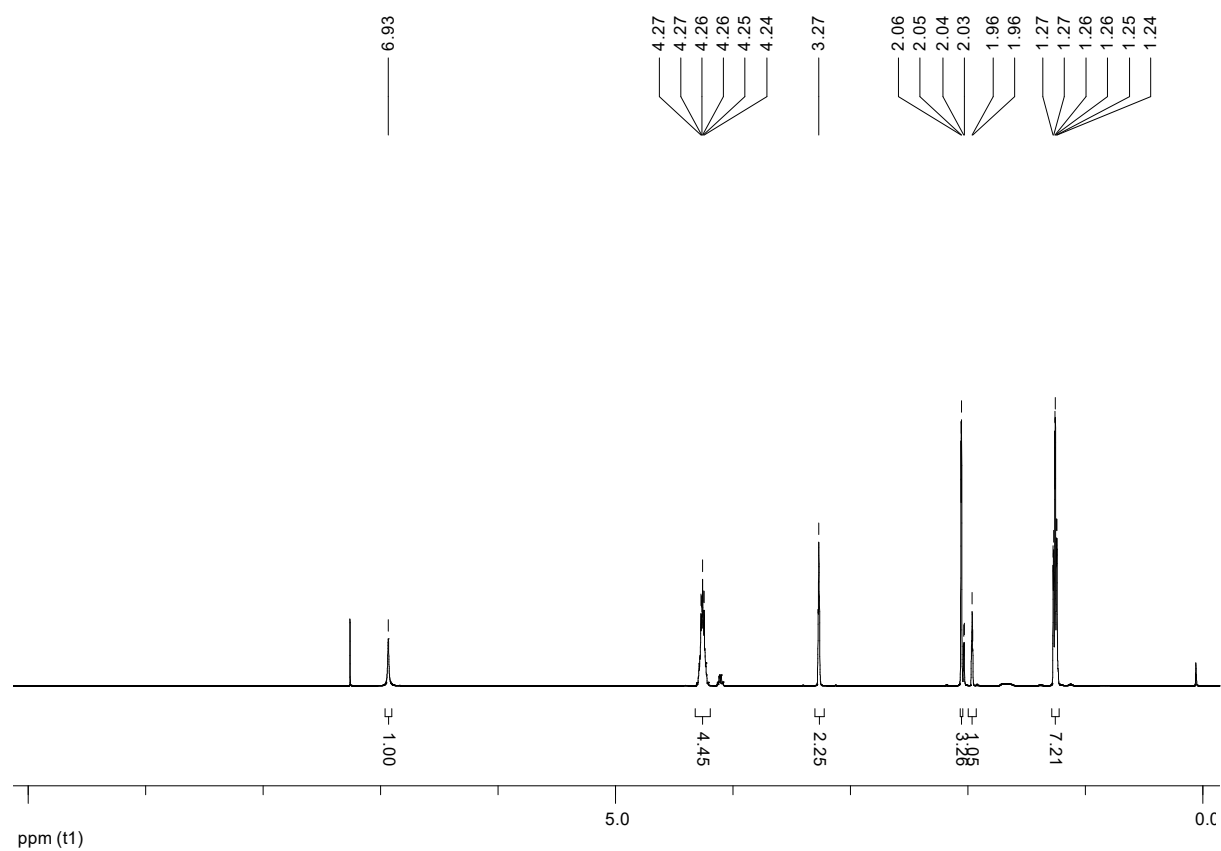


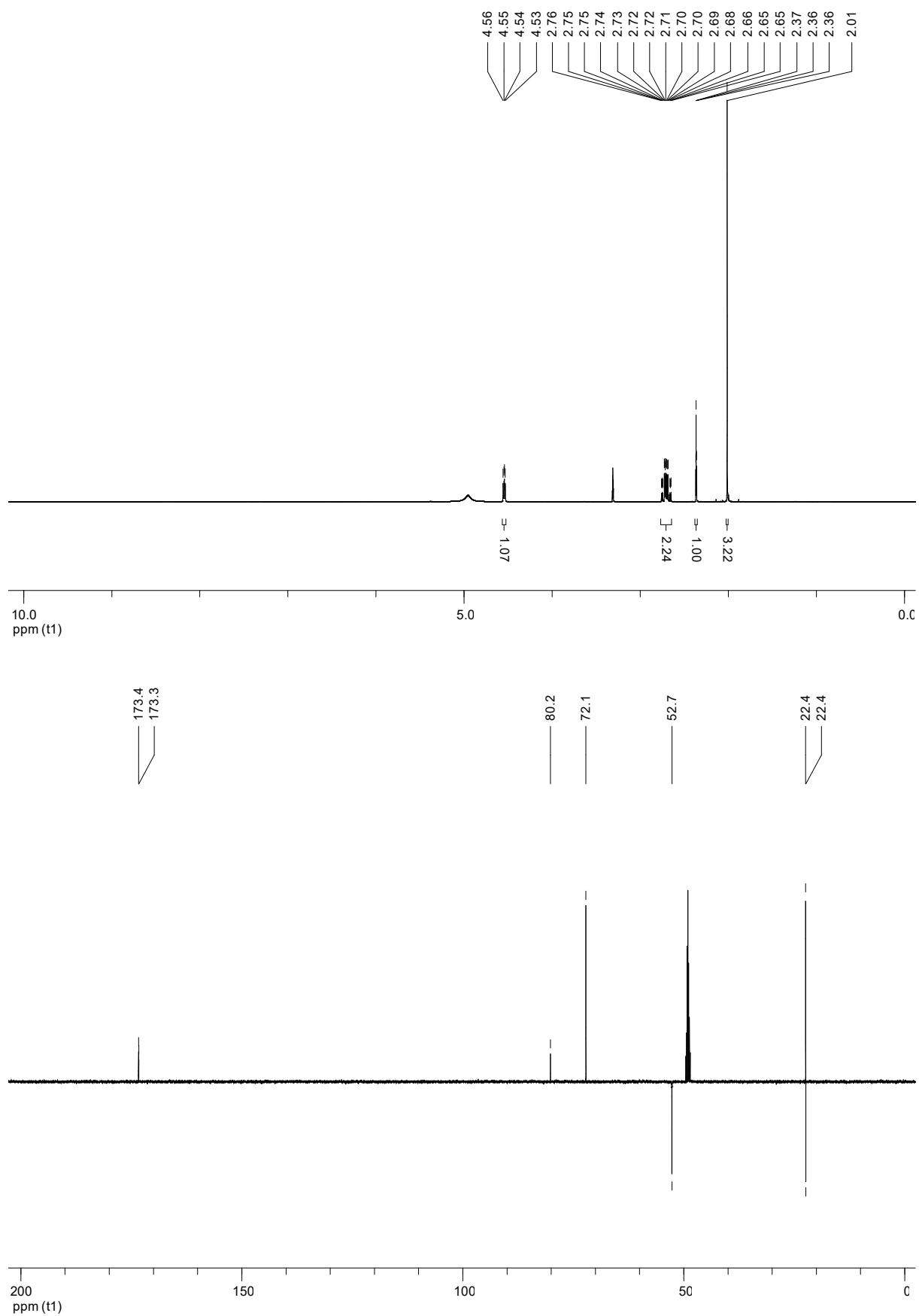
(S)-N-Benzophenon-propargylglycin-imin-*tert*-butylester (¹H-NMR, ¹³C-APT-NMR, CDCl₃)



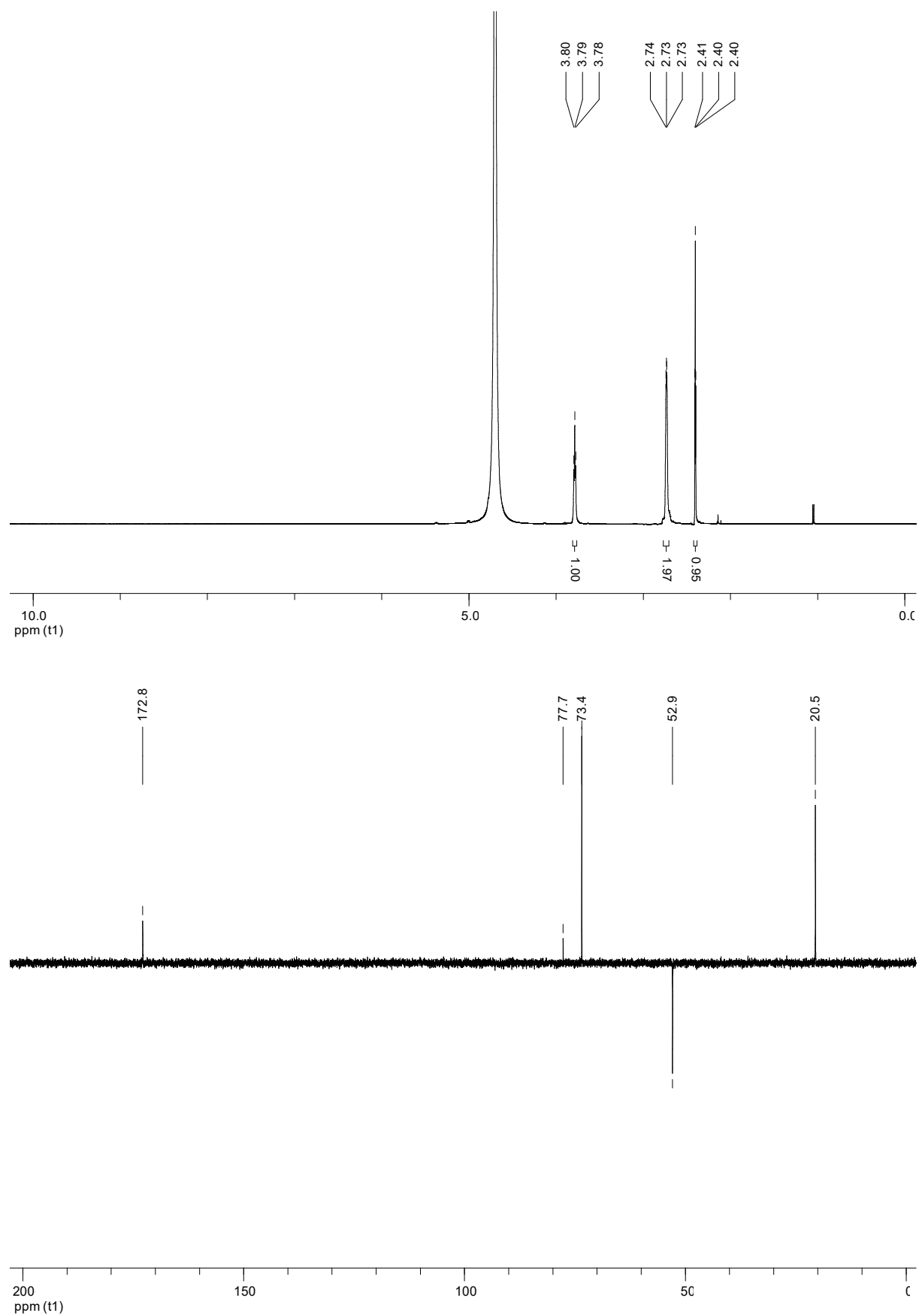
N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CD_3OD)

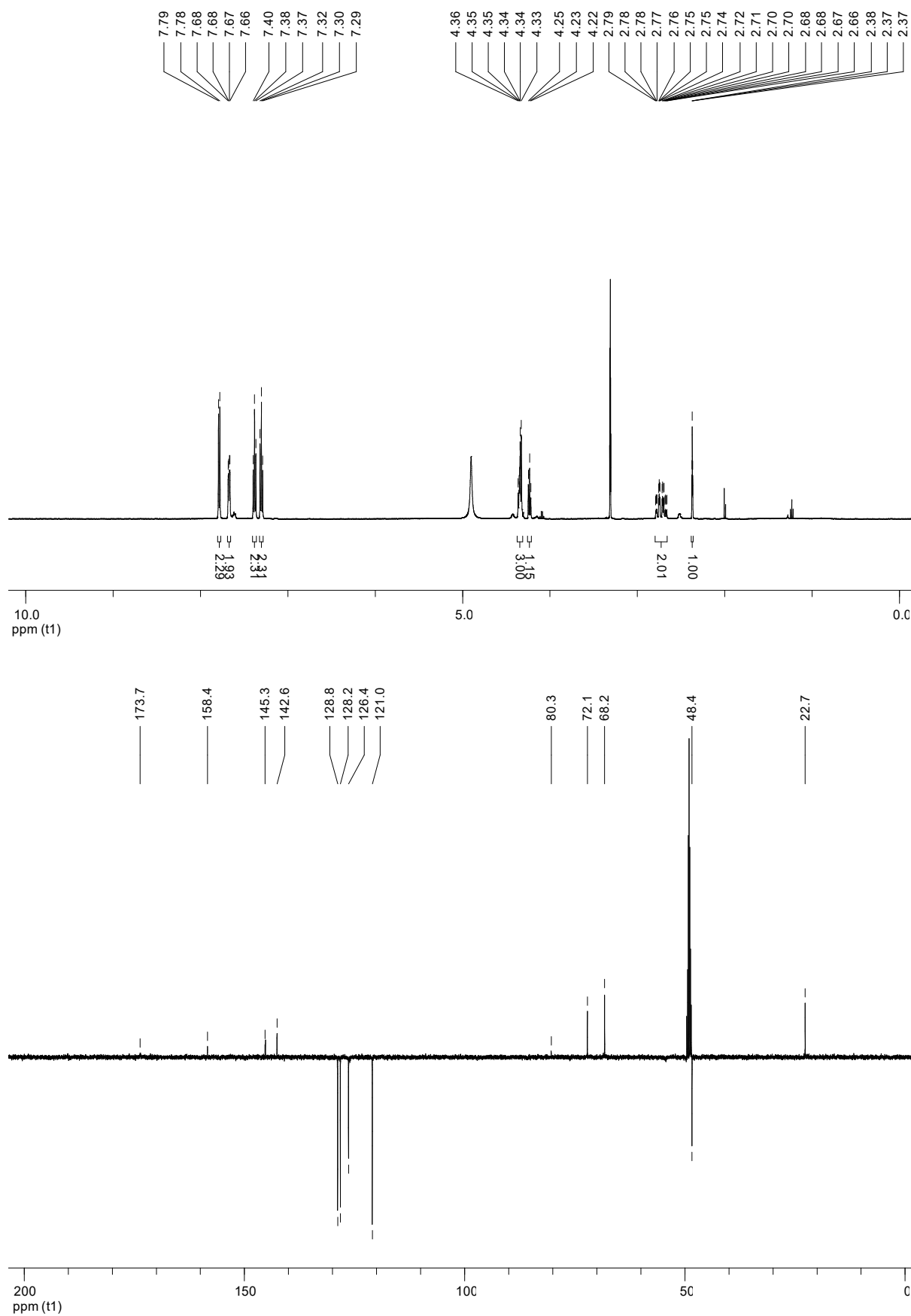
Diethyl-2-acetamido-2-propynylmalonat (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)



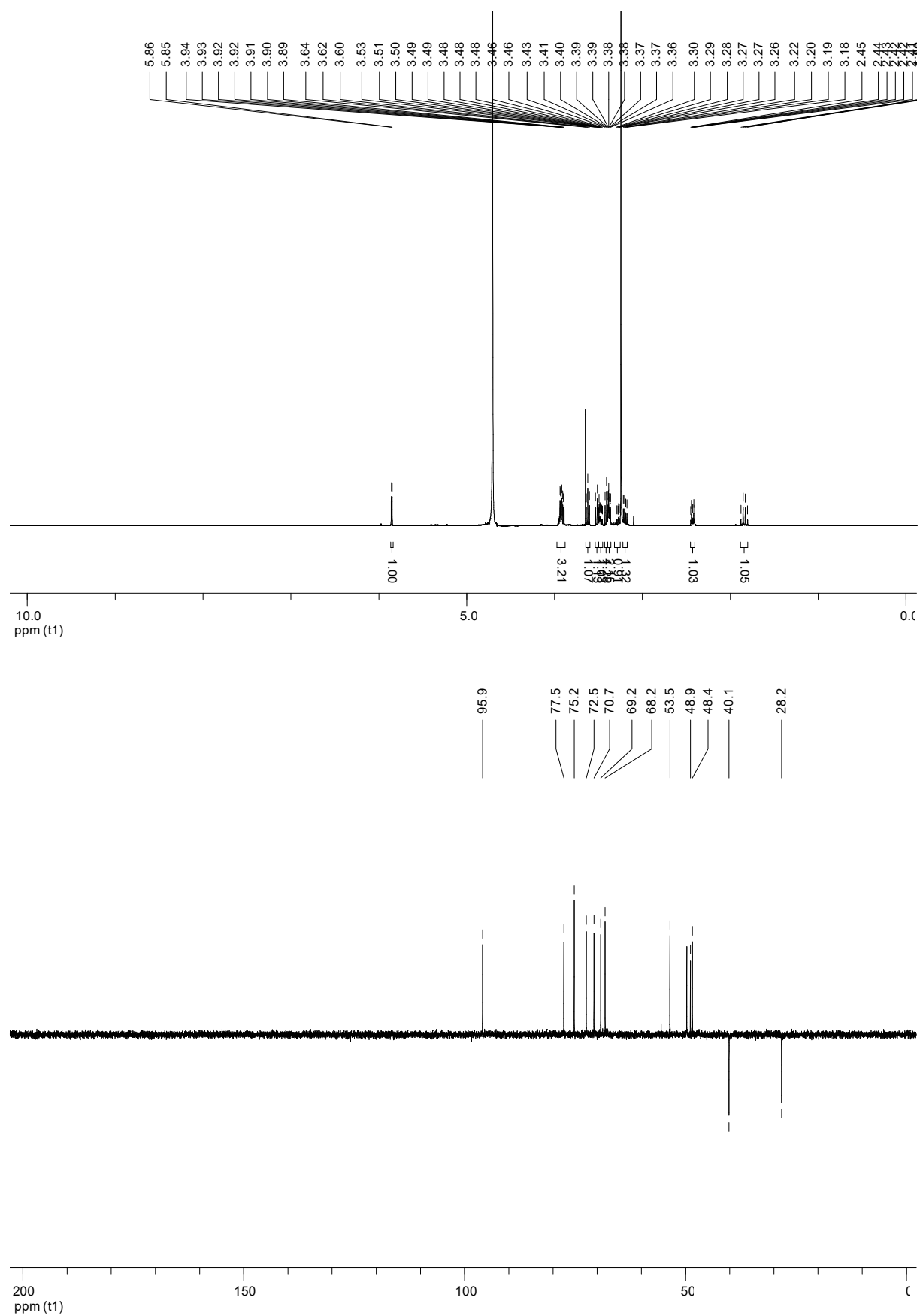
N-Acetylpropargylglycin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CD_3OD)

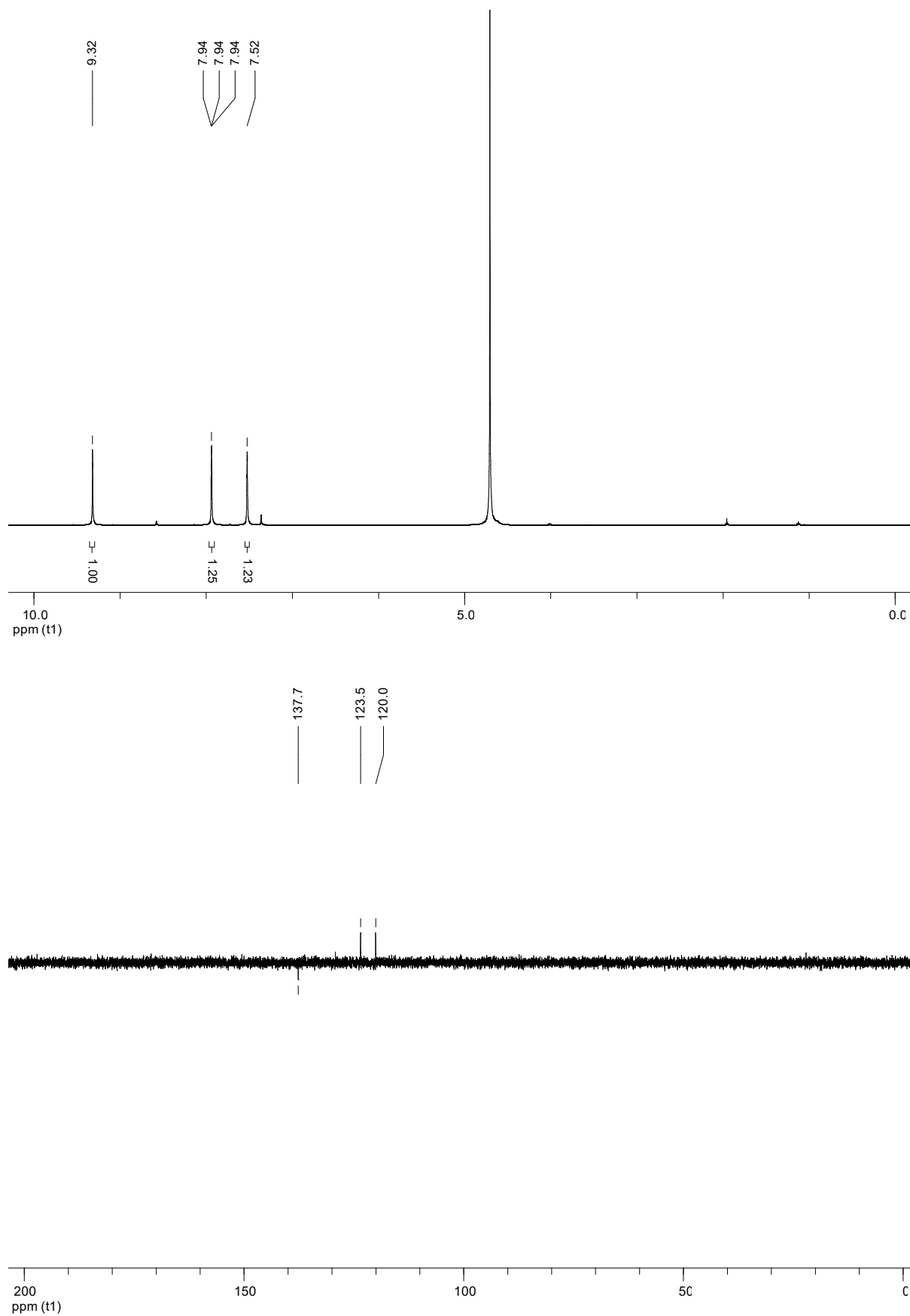
L-Propargylglycine (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, D_2O)



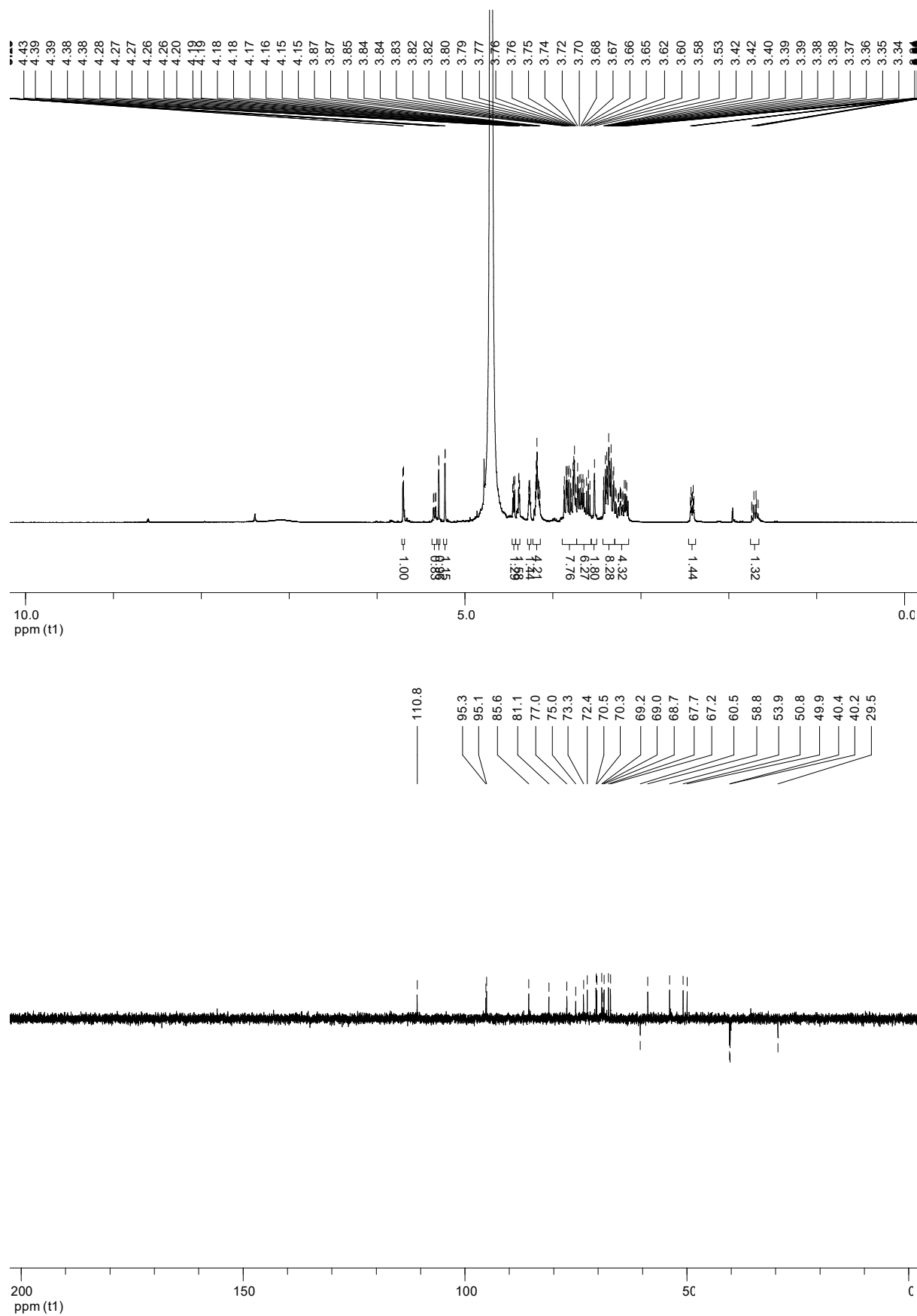
N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-propargylglycin (¹H-NMR, ¹³C-APT-NMR, CD₃OD)

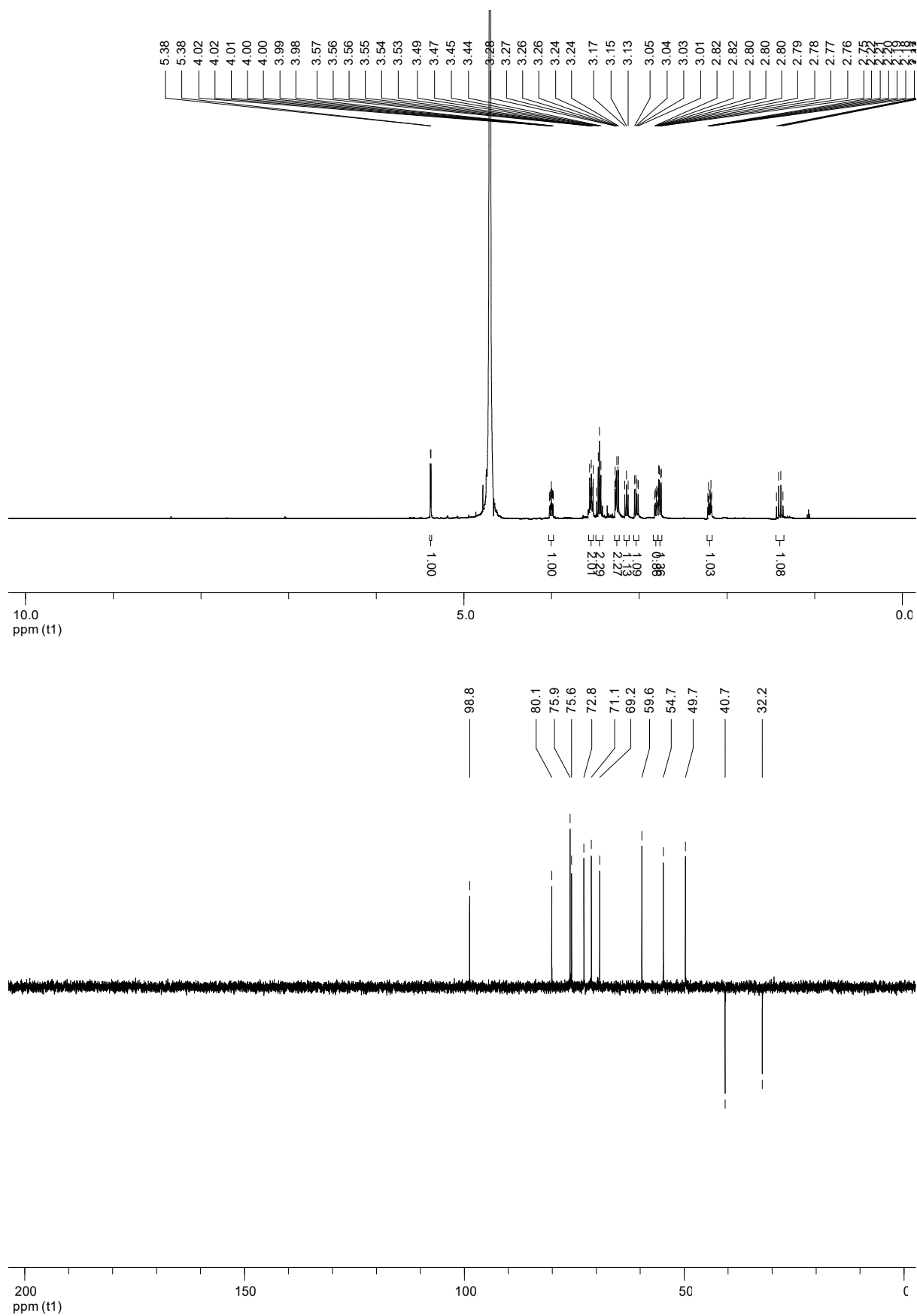
Neamin Tetrahydrochlorid (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, D_2O)



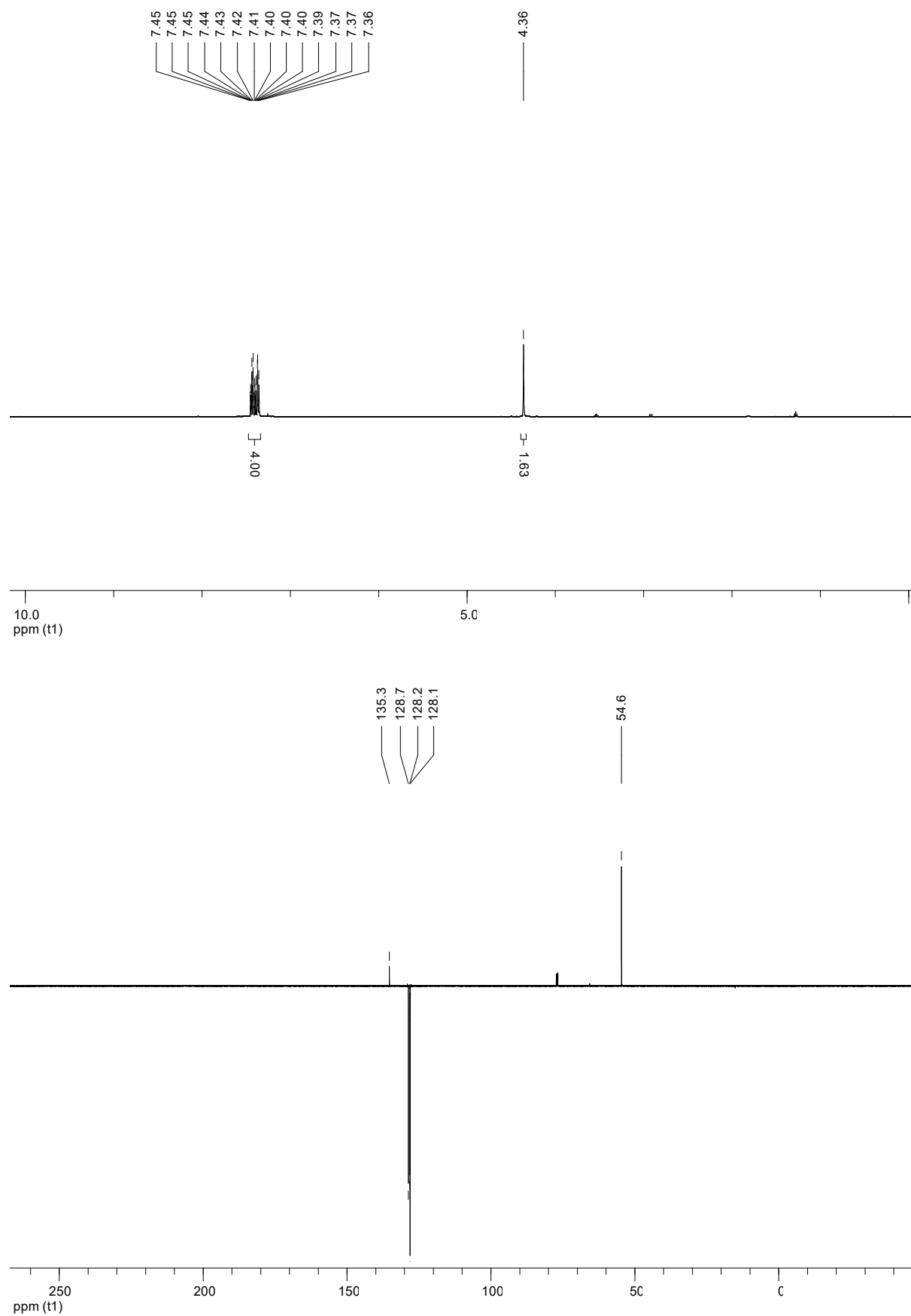
Imidazol-1-sulfonylazid hydrochlorid (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, D_2O)

3-Azido-Neomycin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, D_2O)

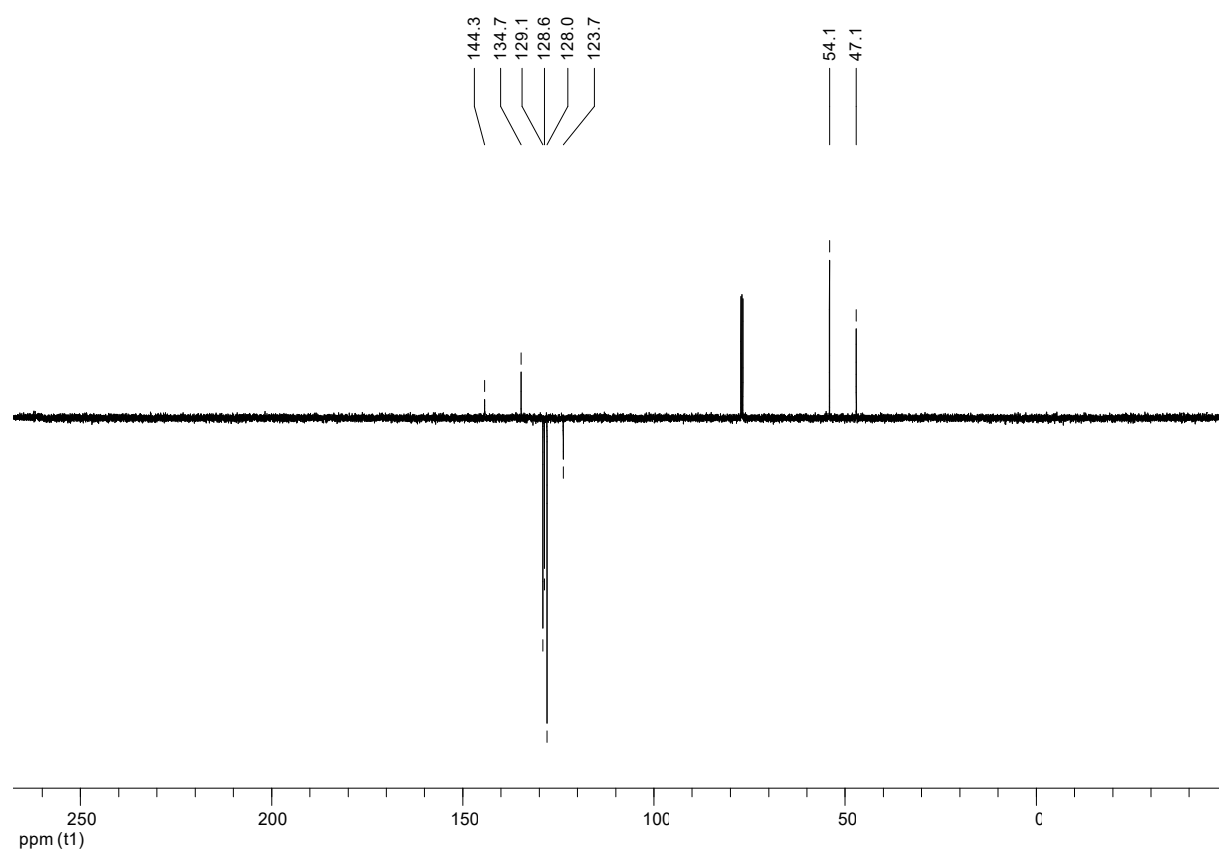
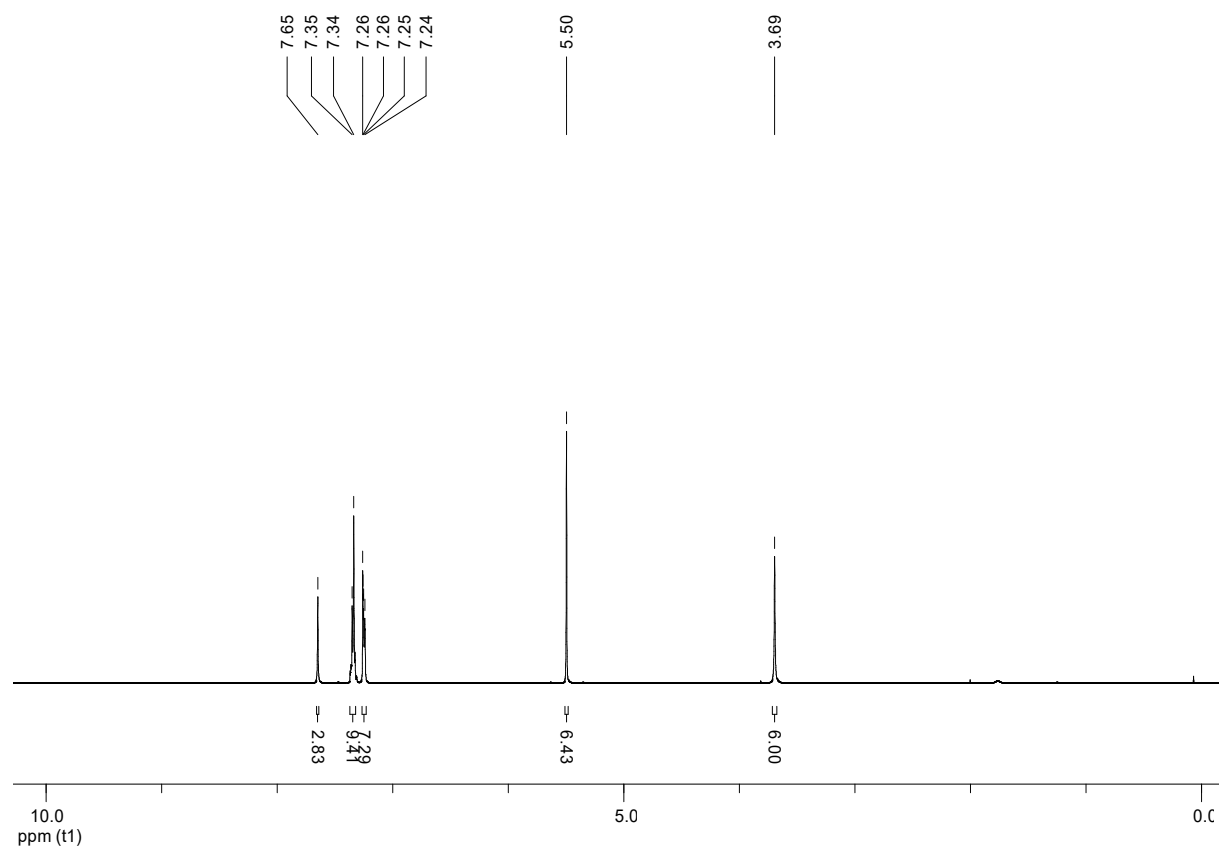


3-Azido-Neamin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, D_2O)

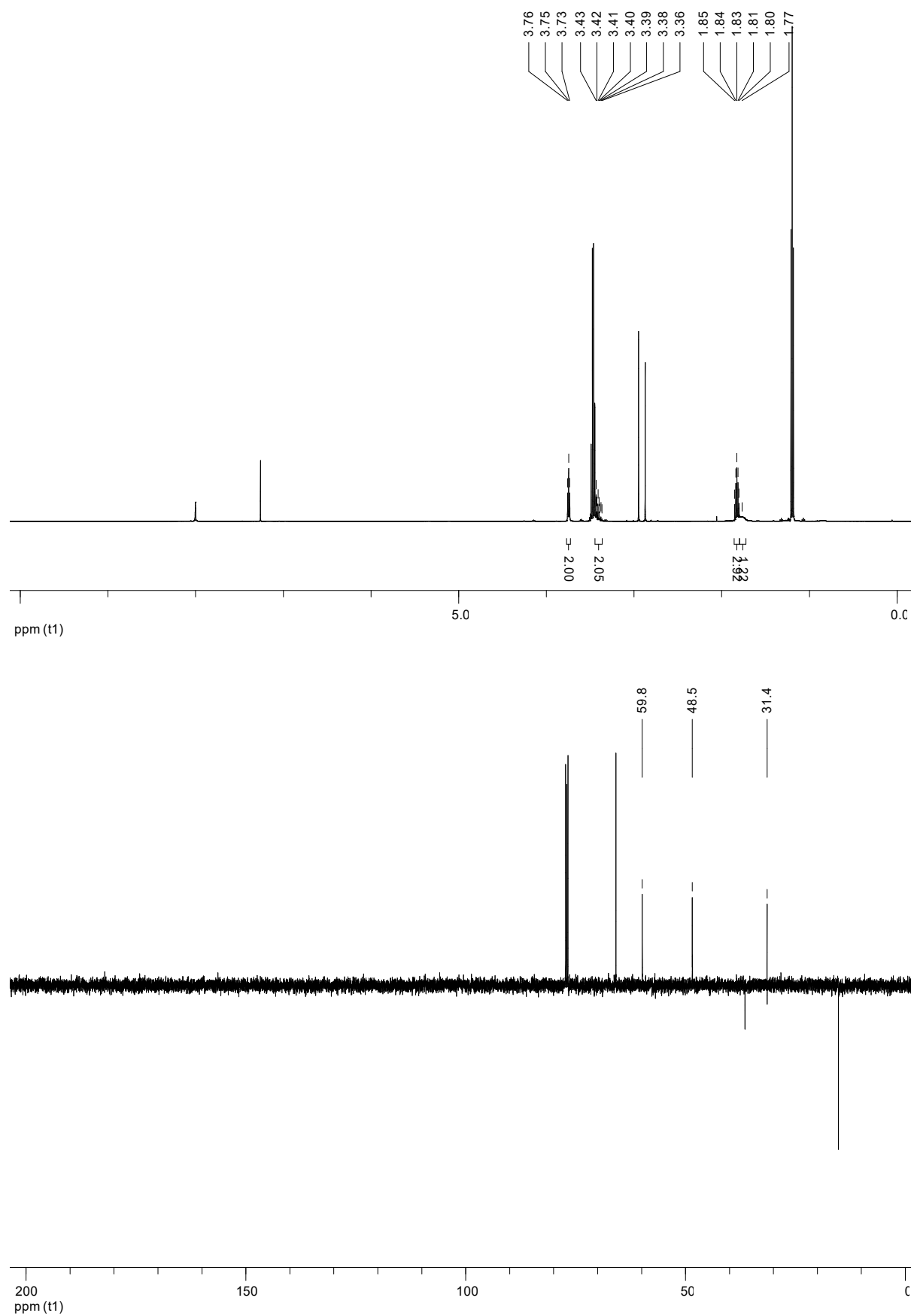
Benzylazid (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

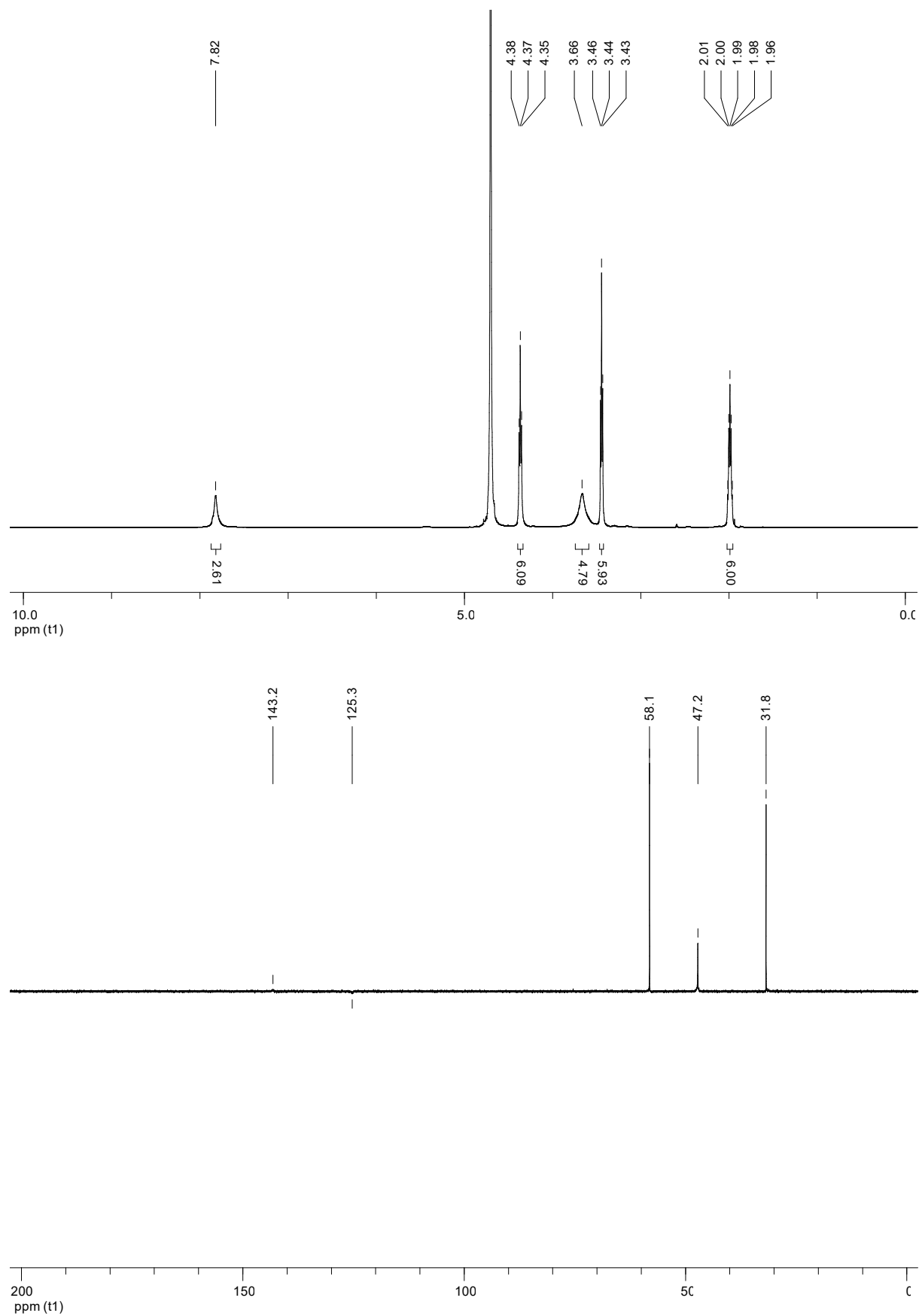


TBTA (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

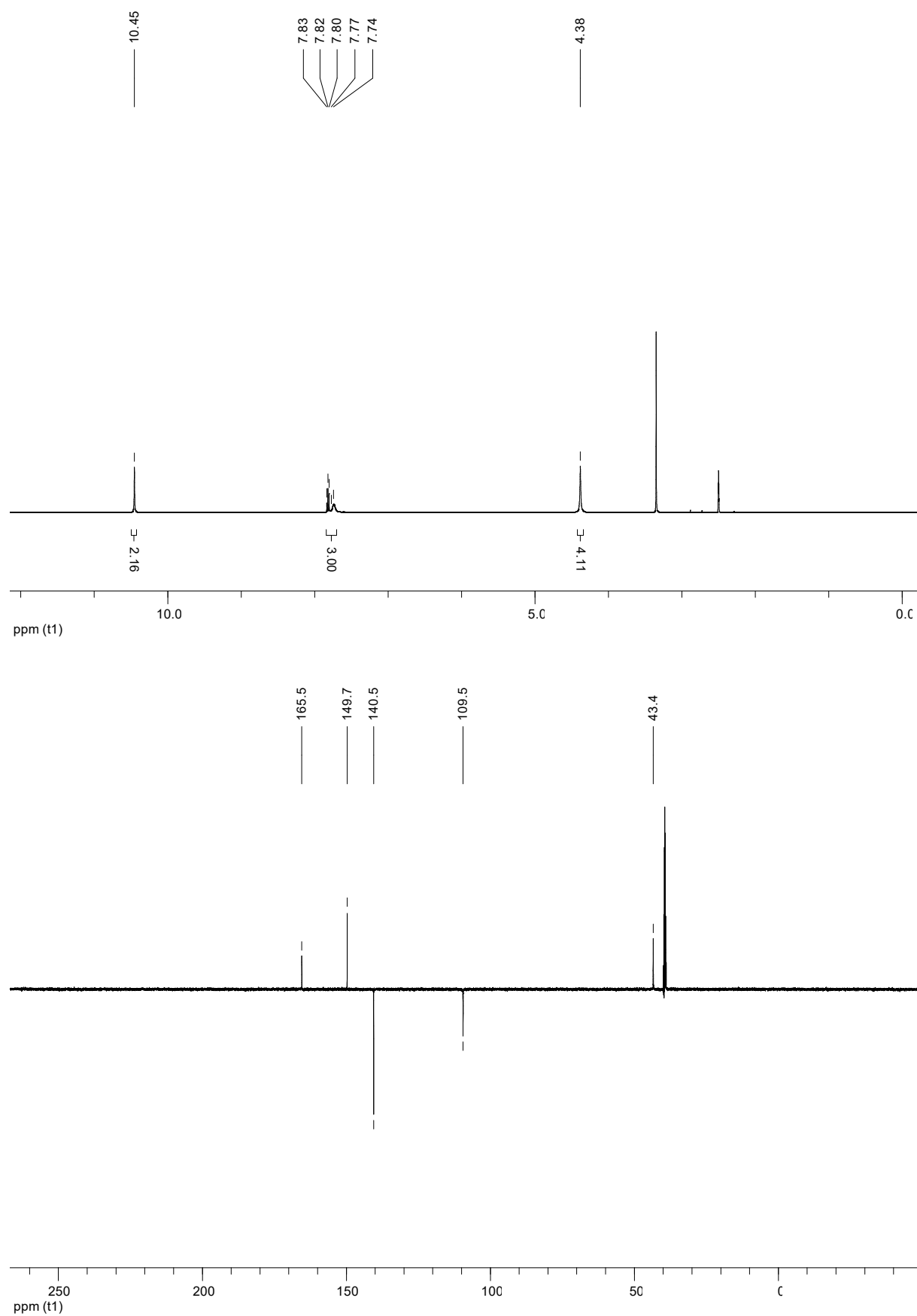


3-Azido-propan-1-ol (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

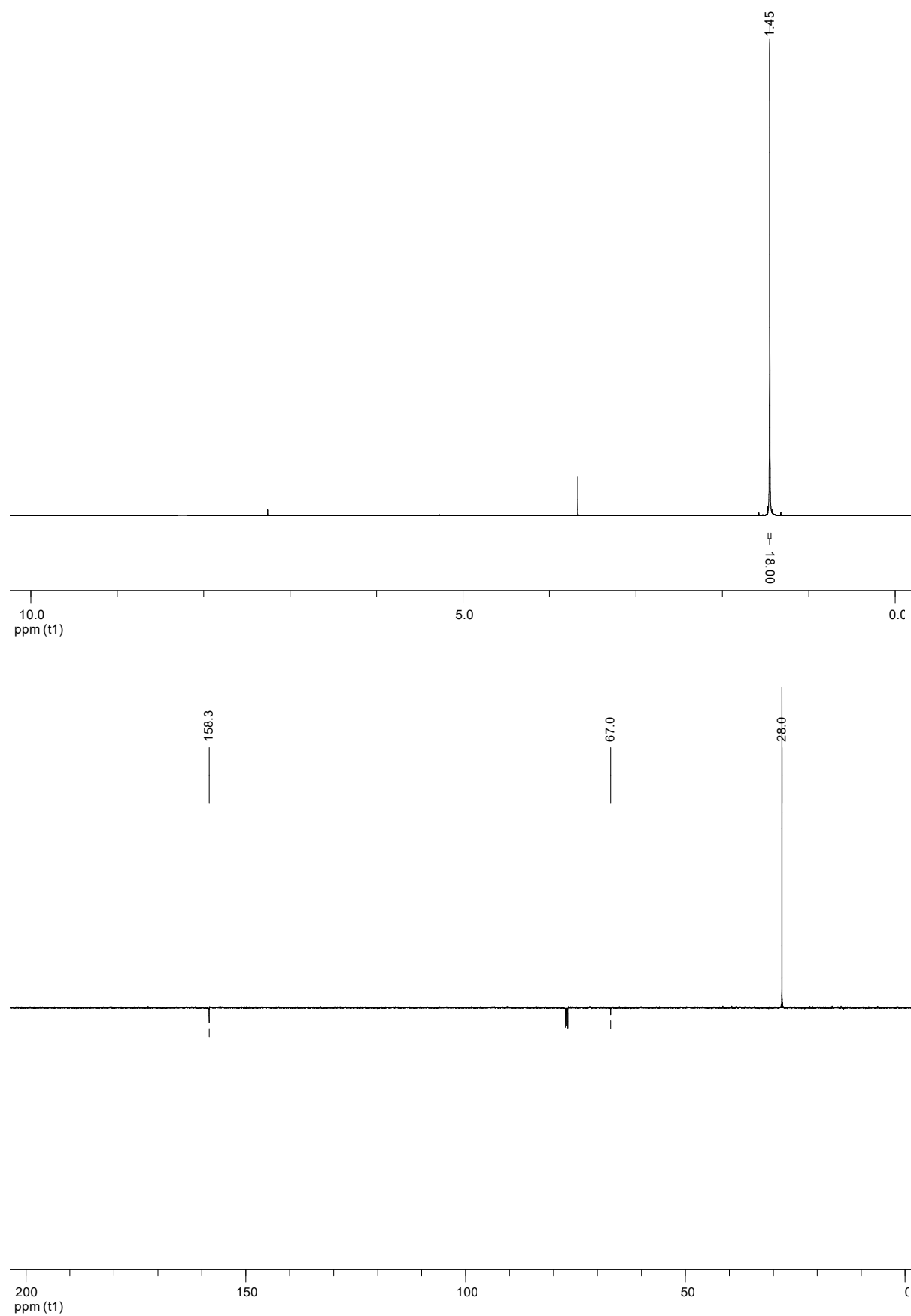


THTPA (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

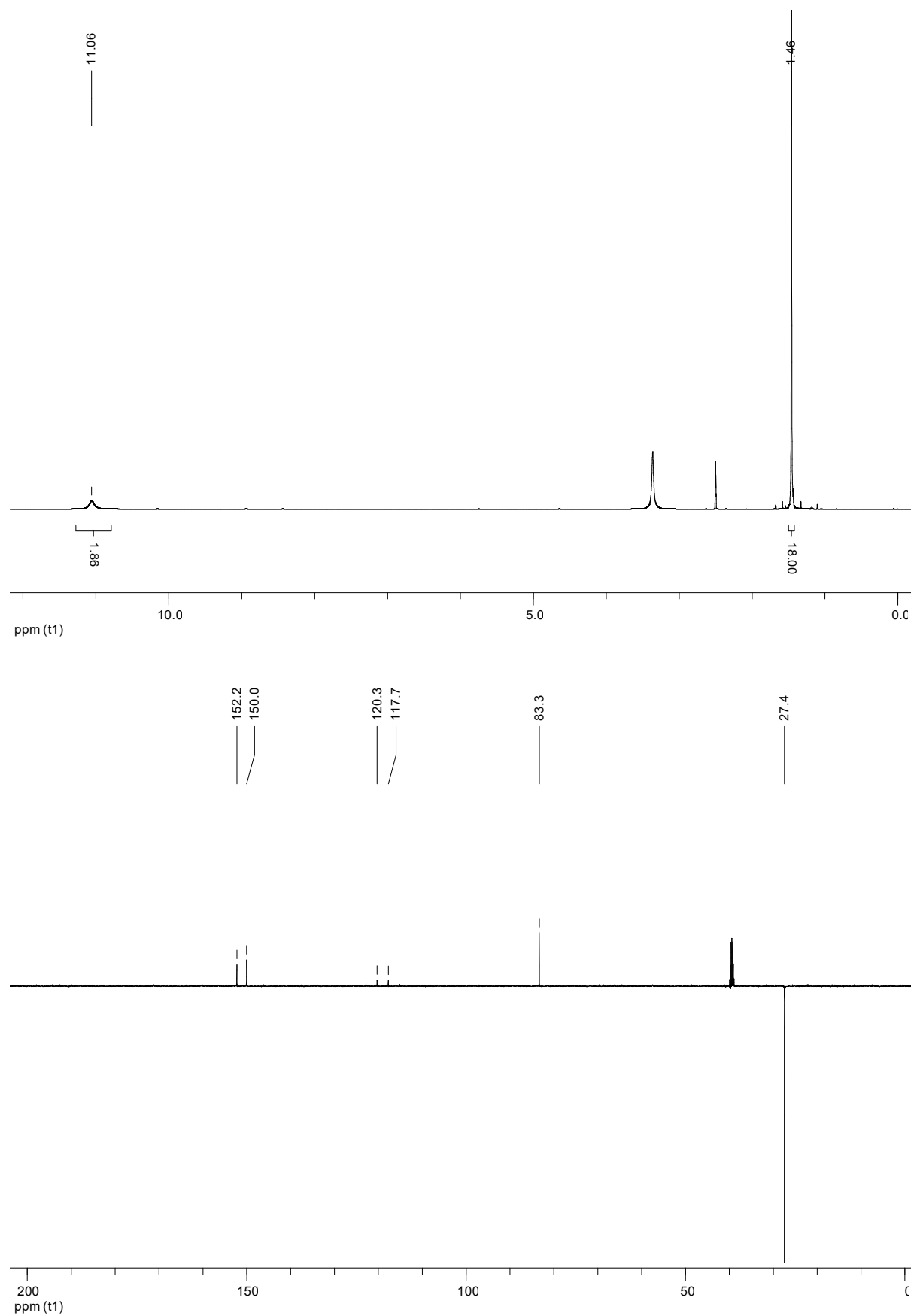
N,N'-Di-chloroacetyl-2,6-diaminopyridin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

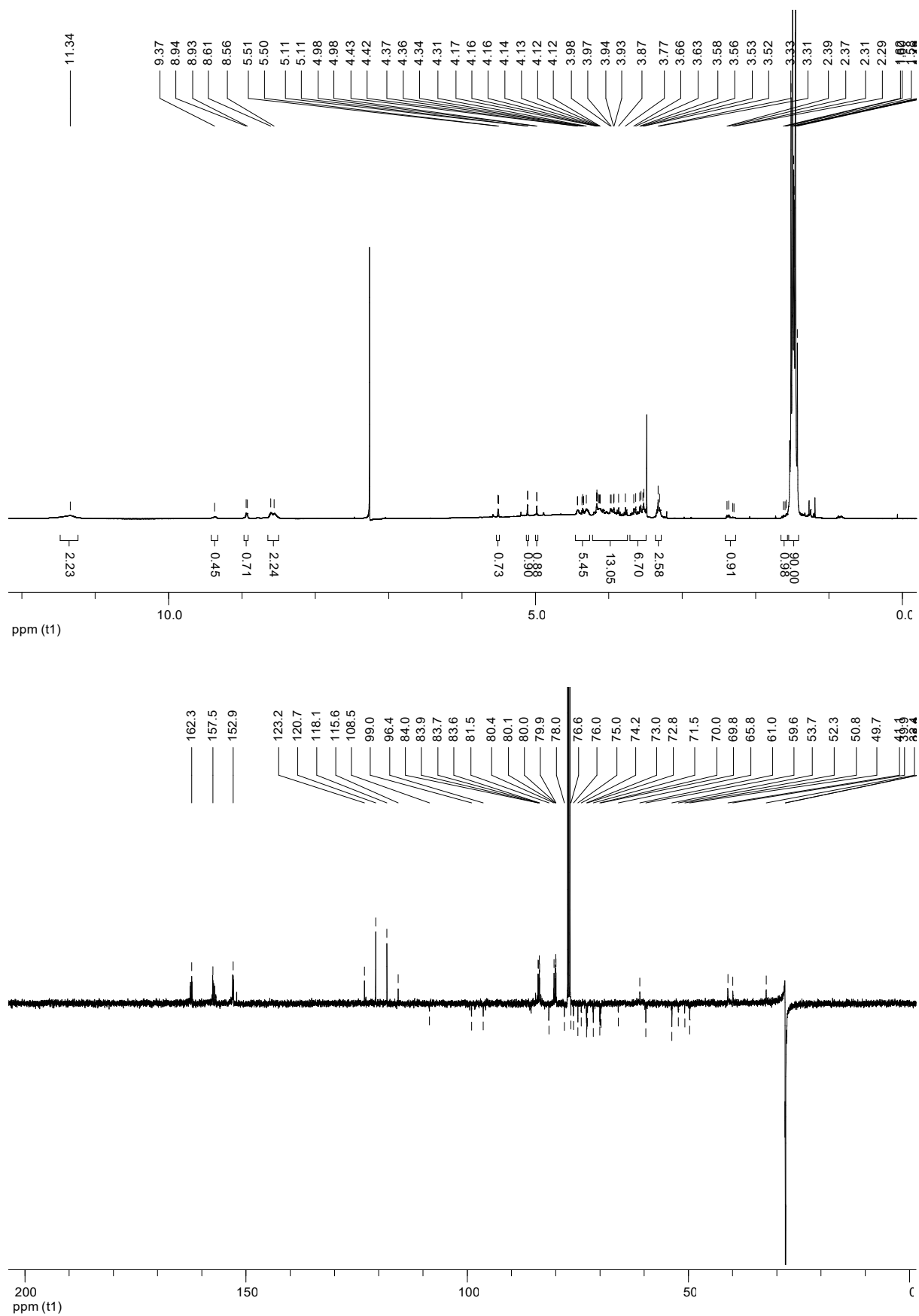


N,N'-Di-*tert*-butyloxycarbonylguanidin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

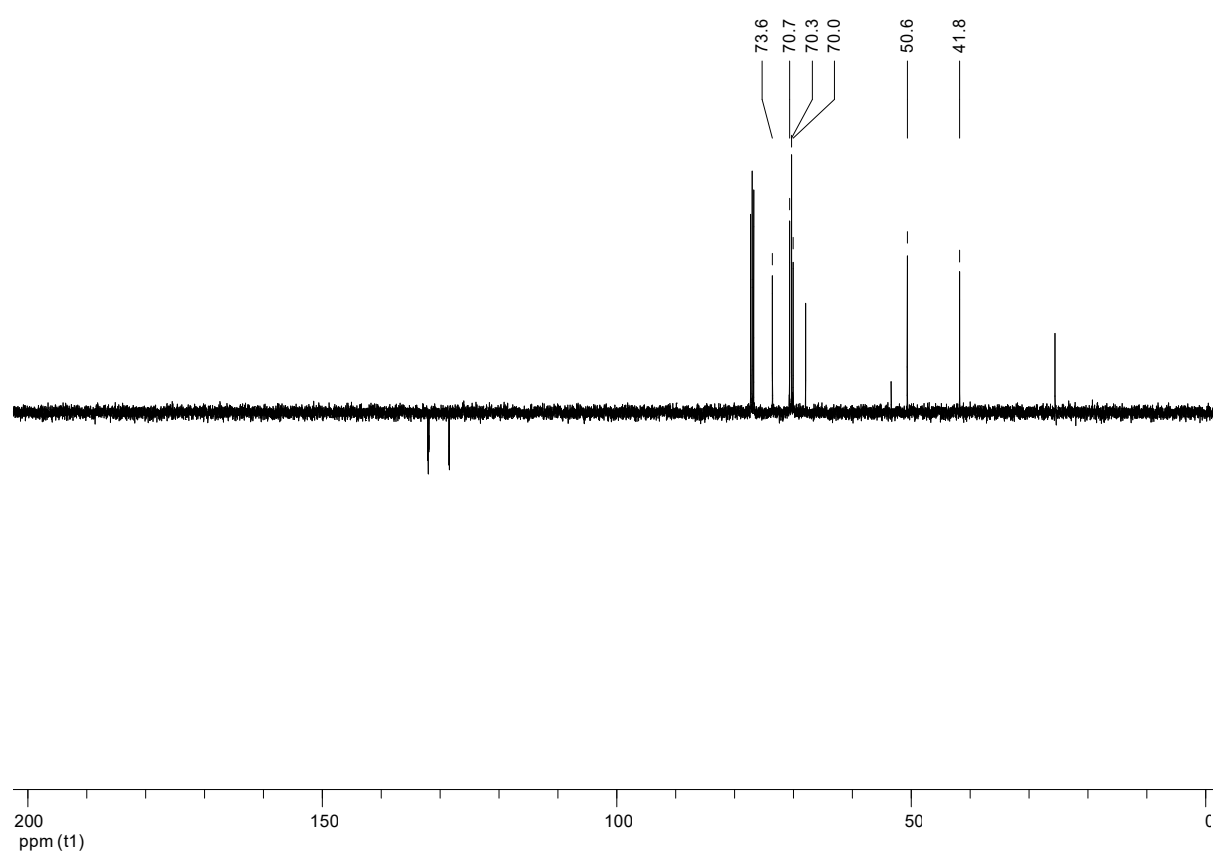
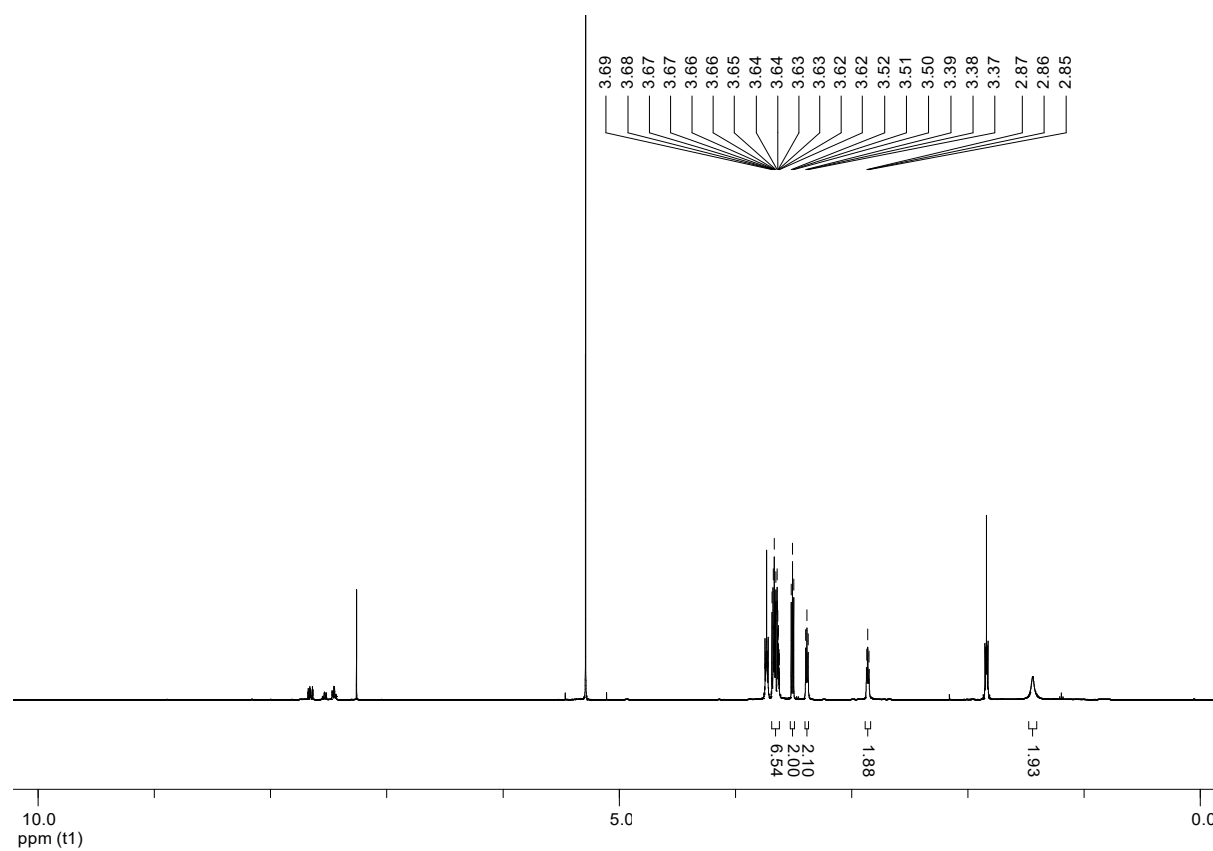


N,N'-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-*N''*-triflylguanidin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, DMSO-d_6)



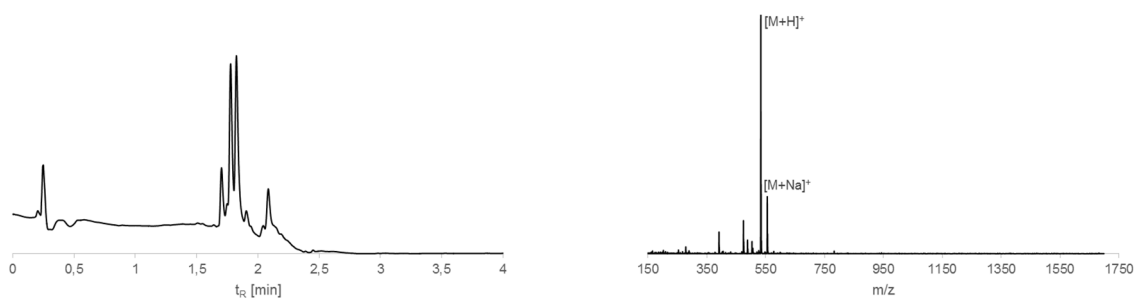
3-Azido-Boc-Gua-Neomycin (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)

[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanazid (^1H -NMR, ^{13}C -APT-NMR, CDCl_3)



N-([2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanazid)-5/6-Fluoresceinamid

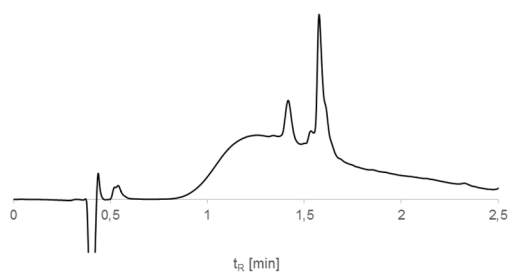
UPLC-MS t_R = 1.77 und 1.82 min (5 – 90 % in 2 min, 254 nm)



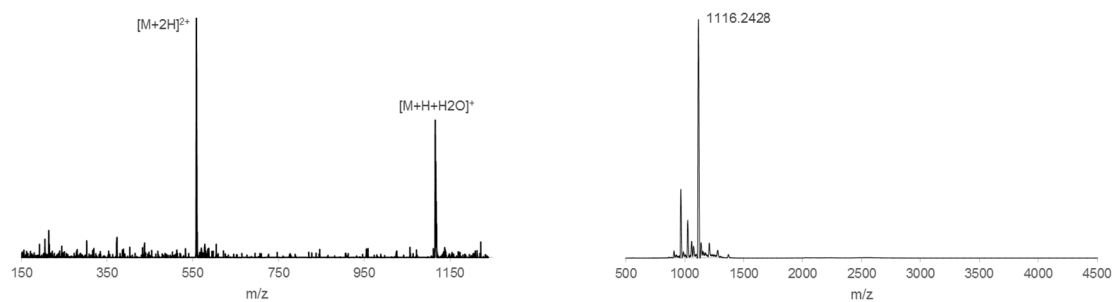
m/z für $[M+Na]^+$ gef. 555.3 und $[M+H]^+$ gef. 533.3.

AcNH CWHYRC CCONH₂ **CP1**

UPLC-MS t_R = 1.57 min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

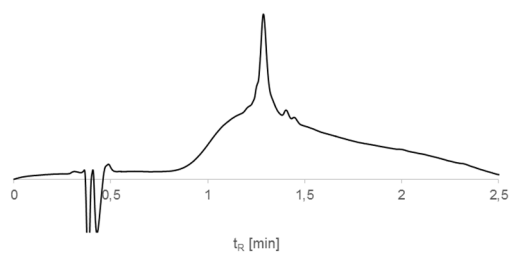


m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1115.5 und $[M+2H]^{2+}$ gef. 548.4

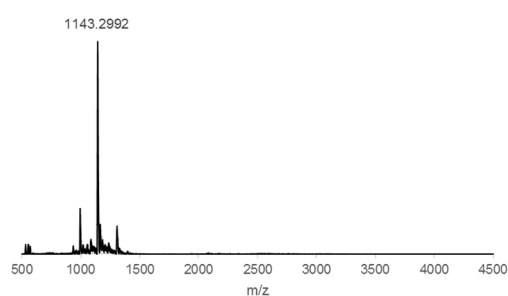
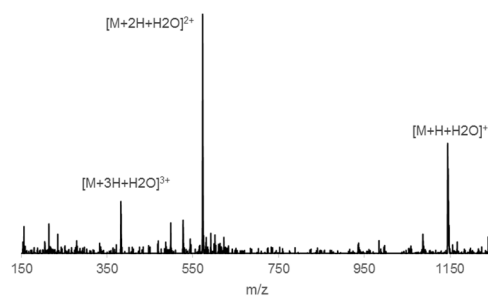
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1116.2428.

AcNHCKRYSHCCONH₂ **cP2**

UPLC-MS t_R = 1.29 min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

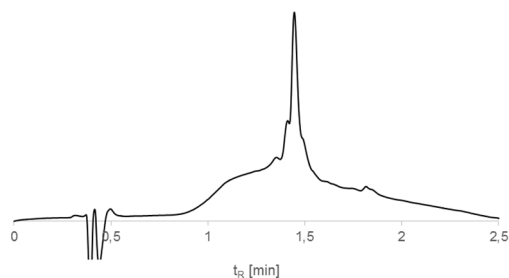


m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1144.6; $[M+2H+H_2O]^{2+}$ gef. 573.0 und $[M+3H+H_2O]^{3+}$ gef. 382.9

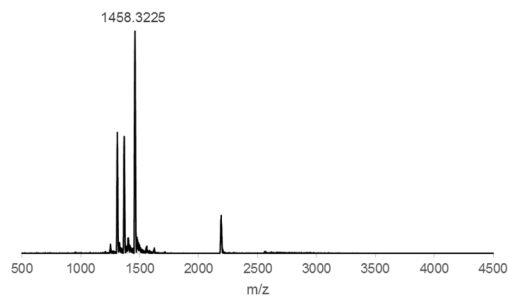
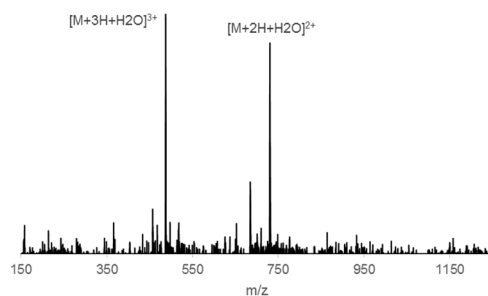
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1143.2992.

AcNHCRSYHWRRCCONH₂ **cP3**

UPLC-MS t_R = 1.44 min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

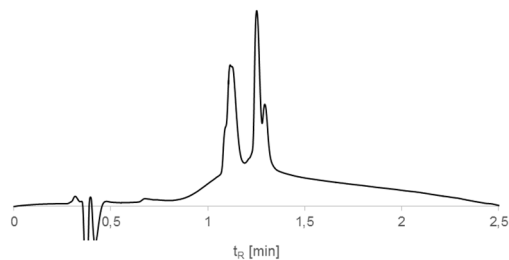


m/z für $[M+2H+H_2O]^{2+}$ gef. 730.4 und $[M+3H+H_2O]^{3+}$ gef. 487.2.

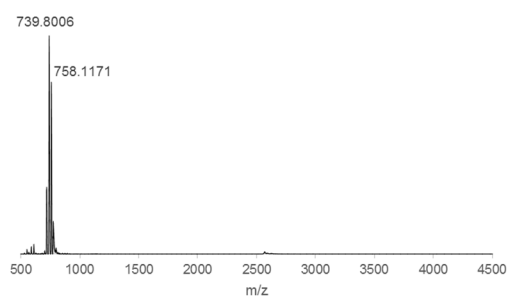
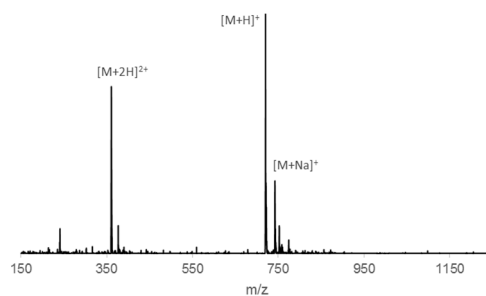
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1458.3225.

AcNHCCKHCCCONH₂ **cP4**

UPLC-MS t_R = 1.25 min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

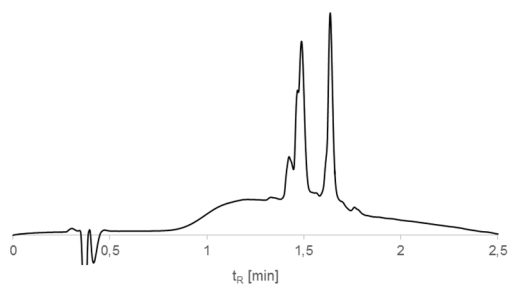


m/z für $[M+Na]^+$ gef. 742.5; $[M+H]^+$ gef. 720.3 und $[M+2H]^{2+}$ gef. 360.6.

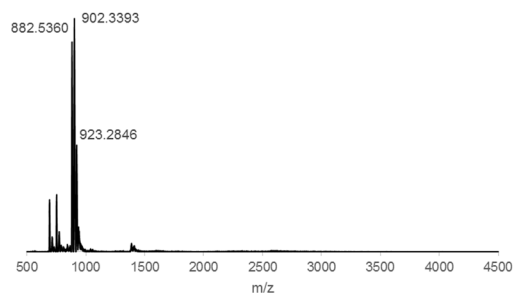
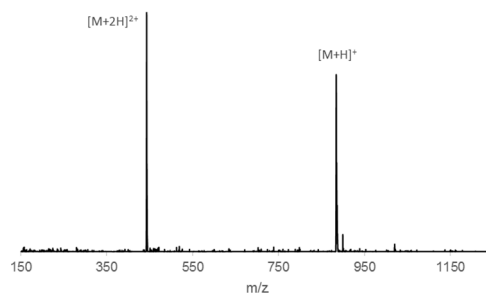
m/z für $[M+K]^+$ gef. 758.1171 und m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 739.8006.

AcNHCRWSCCCONH₂ **cP5**

UPLC-MS t_R = 1.49 und 1.63 min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

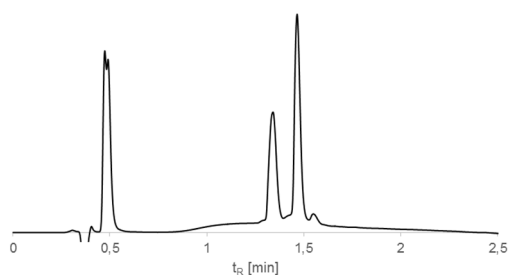


m/z für $[M+H]^+$ gef. 884.3 und $[M+2H]^{2+}$ gef. 442.9.

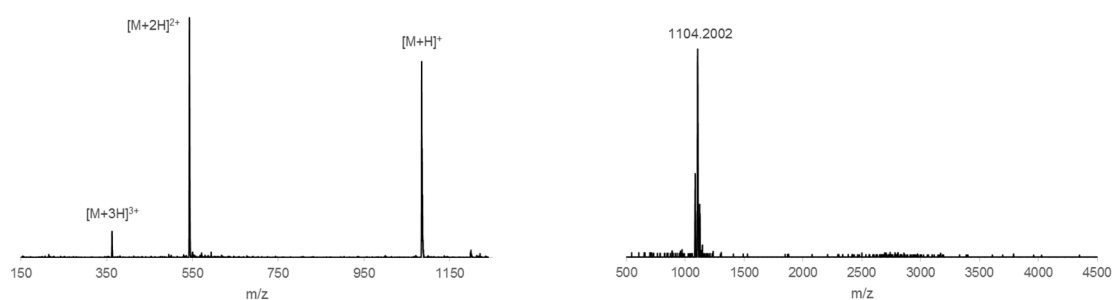
m/z für $[M+K]^+$ gef. 923.4252; m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 902.3393 und m/z für $[M+H]^+$ gef. 882.5360.

AcNHCY-Pra-SRKCCONH₂ **cP6**

UPLC-MS t_R = 1.34 und 1.46 min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

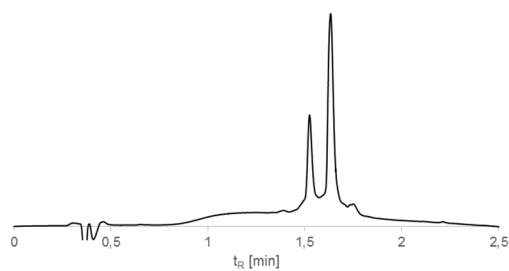


m/z für $[M+H]^+$ gef. 1084.5; $[M+2H]^{2+}$ gef. 542.9 und $[M+3H]^{3+}$ 362.3.

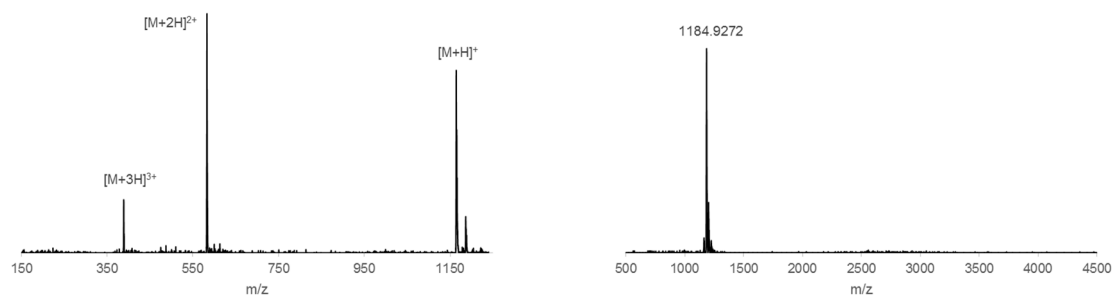
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1104.2002.

AcNHCWK-Pra-YHCCCONH₂ **cP7**

UPLC-MS t_R = 1.52 und 1.63 min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)

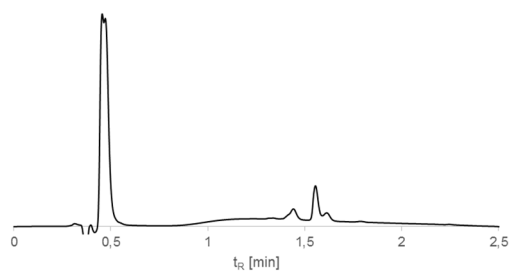


MALDI-TOF

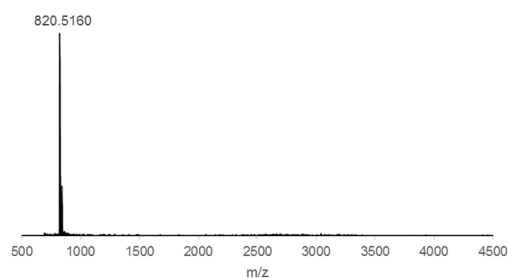
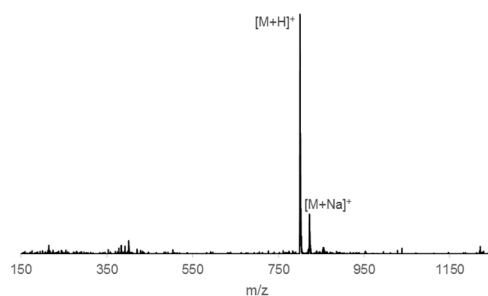
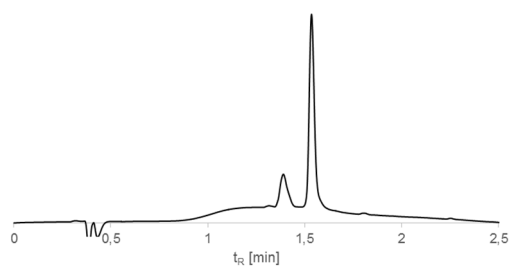


m/z für $[M+H]^+$ gef. 1164.3; $[M+2H]^{2+}$ 582.9 und $[M+3H]^{3+}$ gef. 389.1.

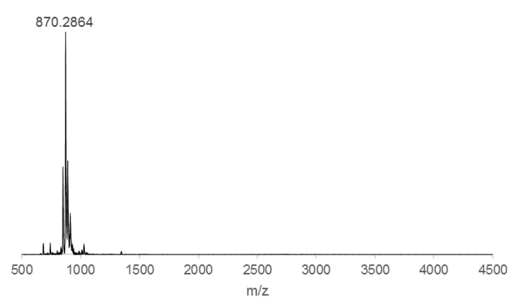
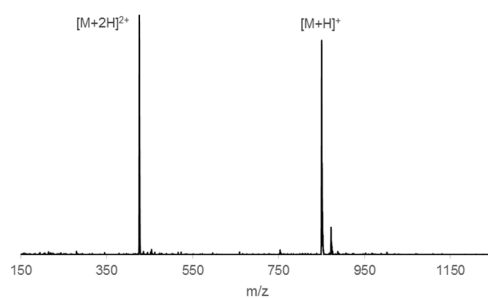
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1184.9272.

AcNHCY-Pra-SC^{CONH2} **cP8**UPLC-MS $t_R = 1.56$ min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)

MALDI-TOF

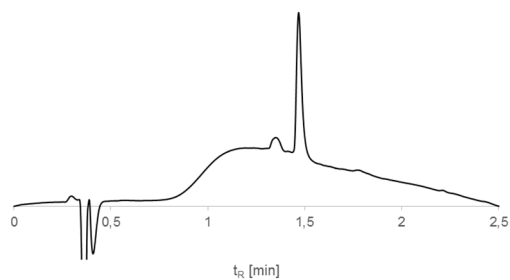
 m/z für $[M+Na]^+$ gef. 822.3 und $[M+H]^+$ gef. 800.3. m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 820.5160.AcNHC-Pra-YHC^{CONH2} **cP9**UPLC-MS $t_R = 1.53$ min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)

MALDI-TOF

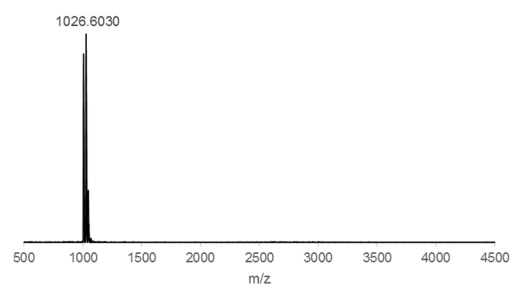
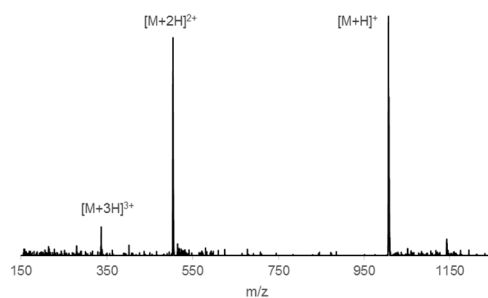
 m/z für $[M+H]^+$ gef. 850.4 und $[M+2H]^{2+}$ 426.0. m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 870.2864.

AcNHCY-Pra-RHCCONH₂ **cP10**

UPLC-MS $t_R = 1.47$ min (3 – 60 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

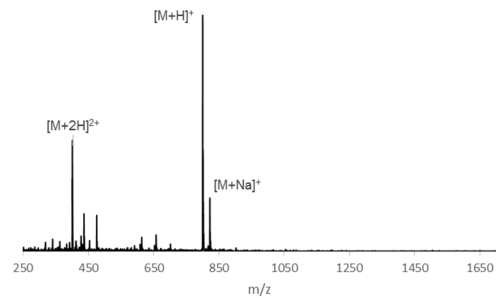
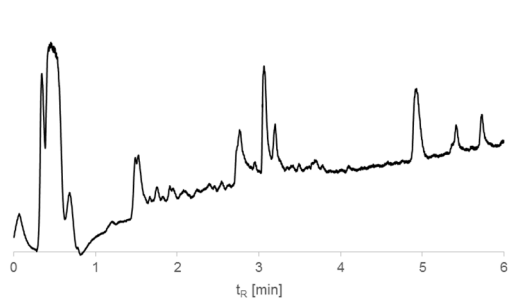


m/z für $[M+H]^+$ gef. 1006.4; $[M+2H]^{2+}$ gef. 503.6 und $[M+3H]^{3+}$ gef. 335.5.

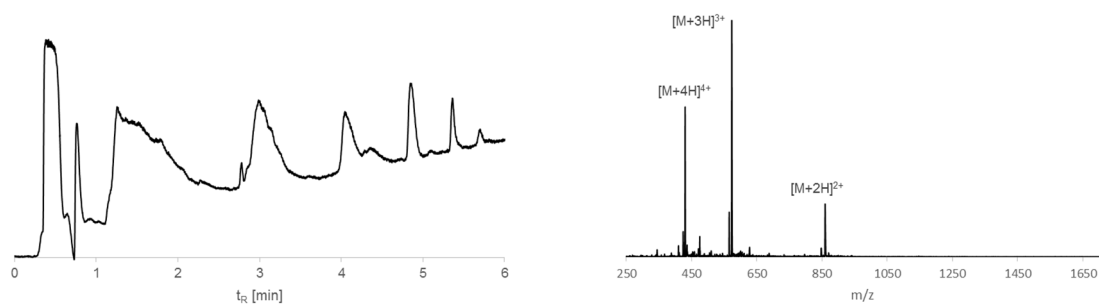
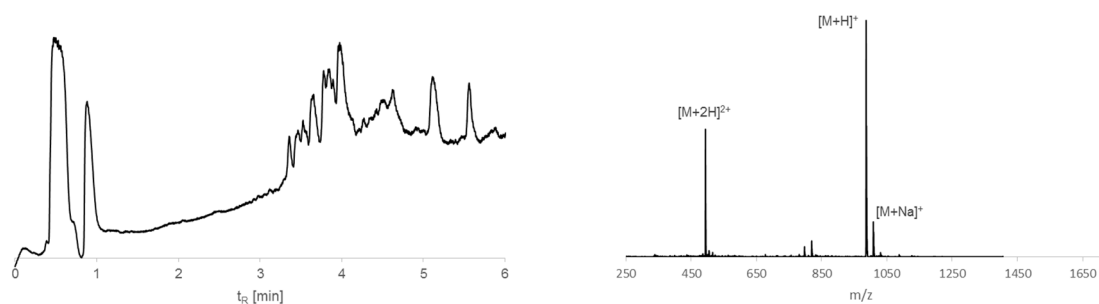
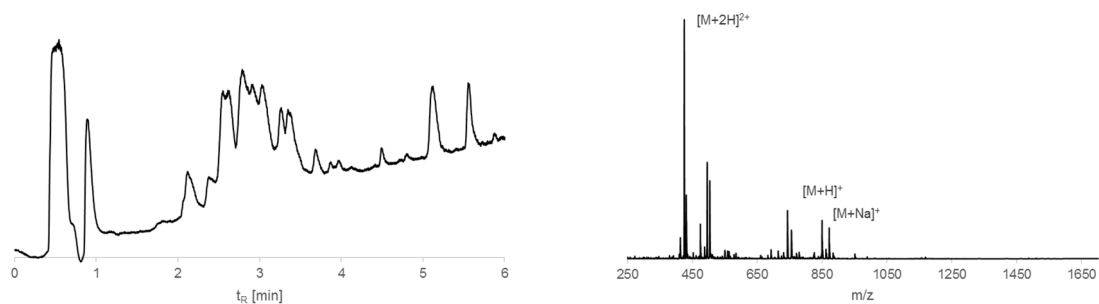
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1026.6030.

AcNHCY-Pra-SCCCONH₂ **cP11**

UPLC-MS $t_R = 3.06$ min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm)

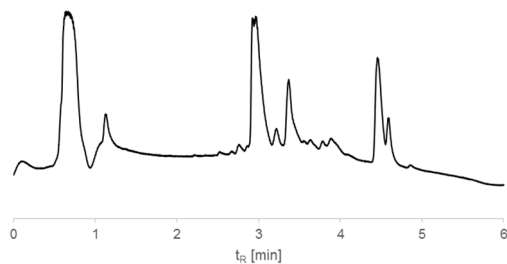


m/z für $[M+Na]^+$ gef. 822.1; $[M+H]^+$ gef. 800.2 und $[M+2H]^{2+}$ gef. 400.7.

AcNH[R(pbf)]RRRCYK-Pra-C^{CONH2} **cP12**UPLC-MS t_R = 2.99 min (3 – 60 % in 2.5 min, 225 nm) m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 859.2; $[M+3H]^{3+}$ gef. 573.3 und $[M+4H]^{4+}$ gef. 430.5.AcNH-C-Pra-SYWC^{CONH2} **cP14**UPLC-MS t_R = 4.05 min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm) m/z für $[M+Na]^+$ gef. 1000.8; $[M+H]^+$ gef. 986.2 und $[M+2H]^{2+}$ gef. 493.9.AcNH-C_{HY}-Pra-C^{CONH2} **cP15**UPLC-MS t_R = 2.79 min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm) m/z für $[M+Na]^+$ gef. 872.1; $[M+H]^+$ gef. 850.2 und $[M+2H]^{2+}$ gef. 425.6.

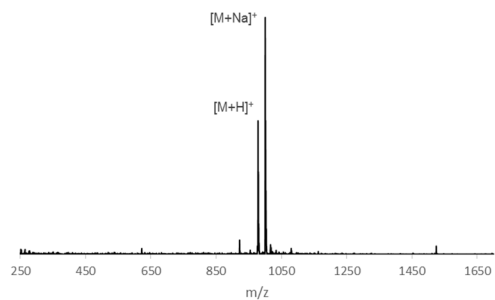
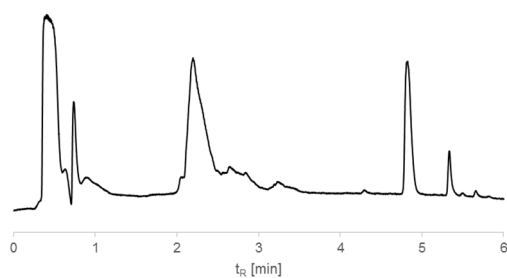
AcNH C-Pra-VYCCONH₂ **cP16**

UPLC-MS $t_R = 2.92$ min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm)



AcNH CY-Pra-HKCCONH₂ **cP17**

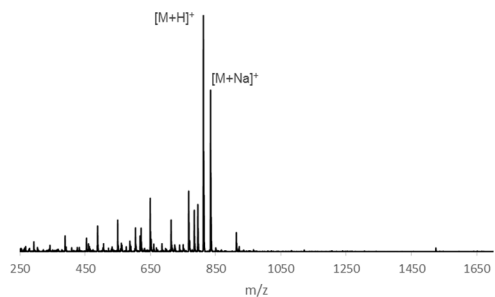
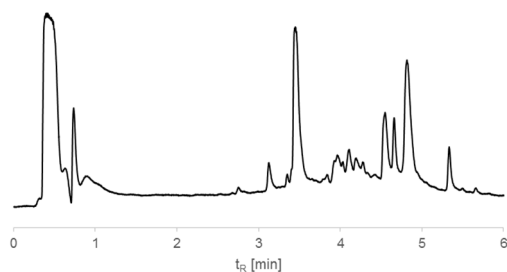
UPLC-MS $t_R = 2.19$ min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm)



m/z für $[M+Na]^+$ gef. 1000.8 und $[M+H]^+$ gef. 978.7.

AcNH C-Pra-VYCCONH₂ **cP18**

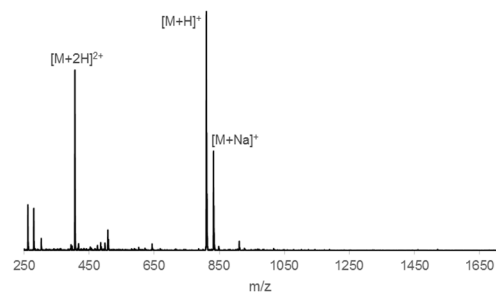
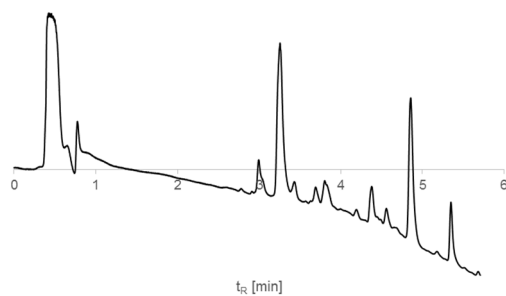
UPLC-MS $t_R = 3.45$ min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm)



m/z für $[M+Na]^+$ gef. 834.2 und $[M+H]^+$ gef. 812.2.

AcNH CY-Pra-PC^{CONH2} **cP30**

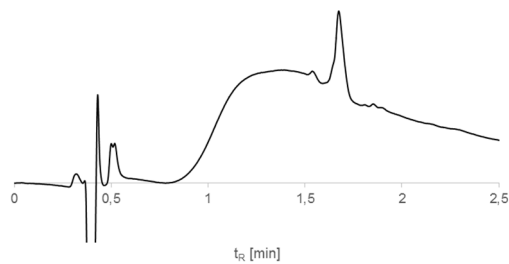
UPLC-MS t_R = 3.45 min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm)



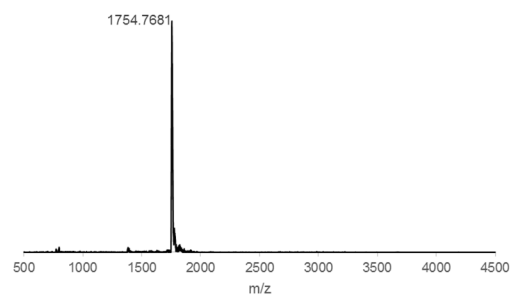
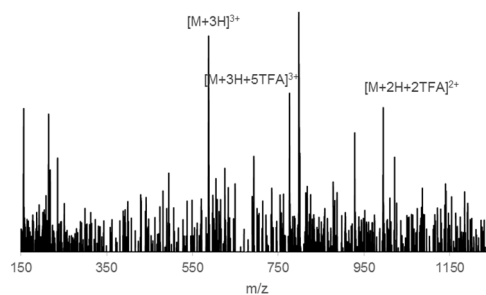
m/z für $[M+Na]^+$ gef. 832.3; $[M+H]^+$ gef. 810.3 und $[M+2H]^{2+}$ gef. 405.7.

AcNH CY-[Pra-Neo]-SC^{CONH2} **cP-A11**

UPLC-MS t_R = 1.66 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

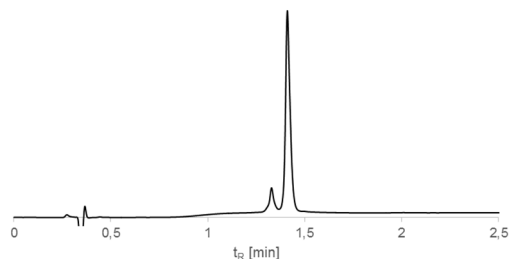


m/z für $[M+2H+2TFA]^{2+}$ gef. 994.3; $[M+3H+5TFA]^{3+}$ gef. 776.3 und $[M+3H]^{3+}$ gef. 587.6.

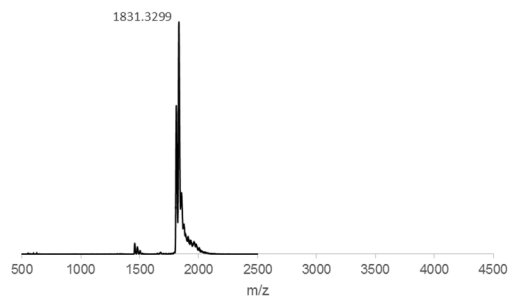
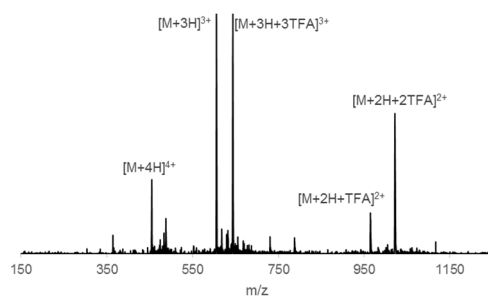
m/z für $[M+H]^+$ gef. 1754.7681.

AcNHRRRRCYK[Pra-Nea]CCONH₂ **cP-A12**

UPLC-MS t_R = 1.41 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

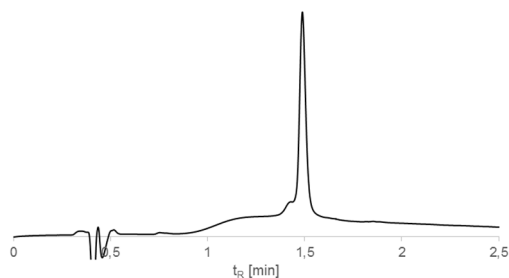


m/z für $[M+2H+2TFA]^{2+}$ gef. 1021.5; m/z für $[M+2H+TFA]^{2+}$ gef. 964.6; m/z für $[M+3H+3TFA]^{3+}$ gef. 643.2; m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 605.4 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ gef. 454.5.

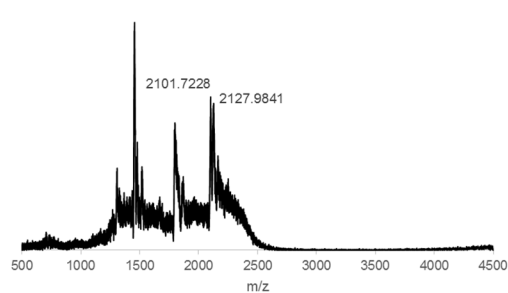
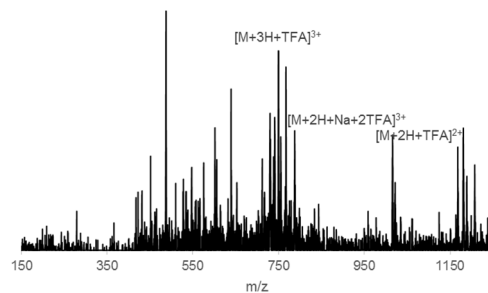
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1831.3299.

AcNHRRRRCYK-[Pra-Neo]-CCONH₂ **cP-A13**

UPLC-MS t_R = 1.48 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

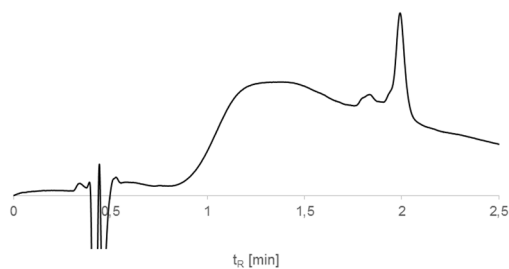


m/z für $[M+2H+TFA]^{2+}$ gef. 1168.1; $[M+2H+Na+2TFA]^{3+}$ gef. 787.7 und $[M+3H+TFA]^{3+}$ gef. 749.5.

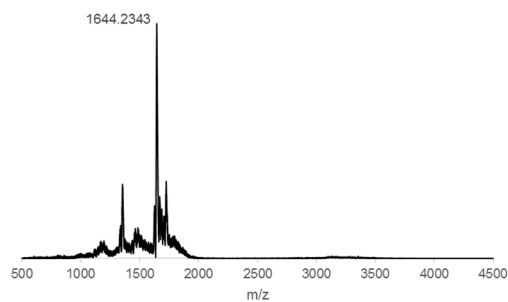
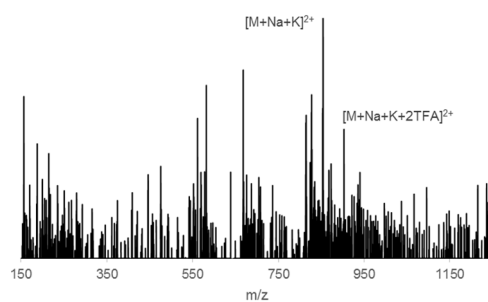
m/z für $[M+Na]^+$ gef. 2127.9841 und m/z für $[M+H]^+$ gef. 2101.7228.

AcNH-C-[Pra-Neo]-SYW-C^{CONH2} **cP-A14**

UPLC-MS $t_R = 1.98$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

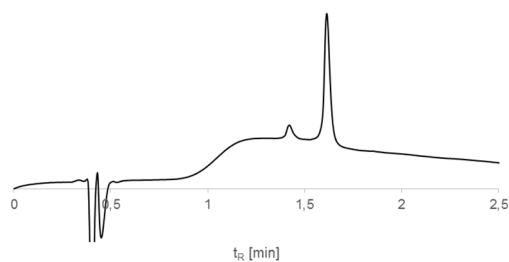


m/z für $[M+Na+K+2TFA]^{2+}$ gef. 902.8 und $[M+Na+K]^{2+}$ gef. 854.1.

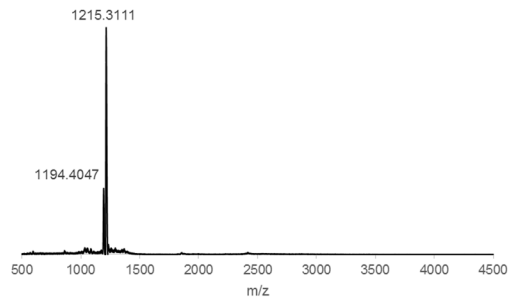
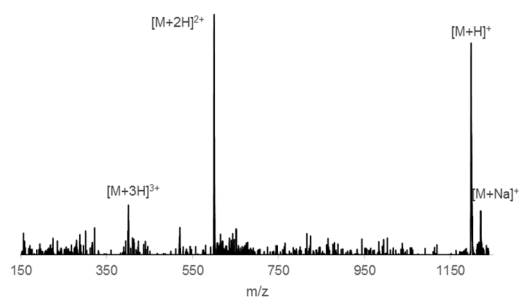
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1644.2343.

AcNH-C^{HY}-[Pra-Nea]-C^{CONH2} **cP-A15**

UPLC-MS $t_R = 1.61$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

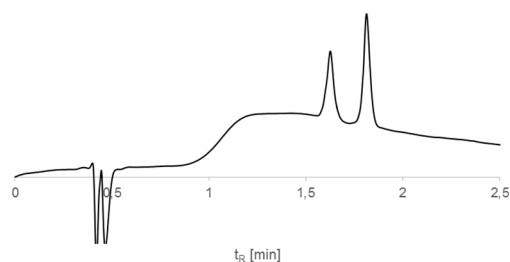


m/z für $[M+Na]^+$ gef. 1221.6; m/z für $[M+H]^+$ gef. 1198.6; m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 600.1 und $[M+3H]^{3+}$ gef. 400.2.

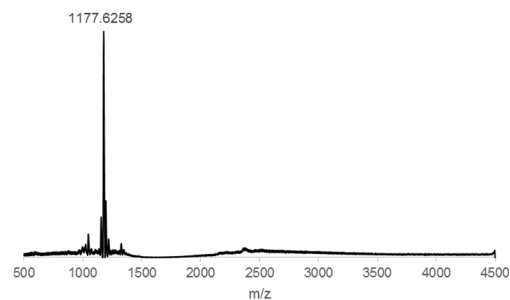
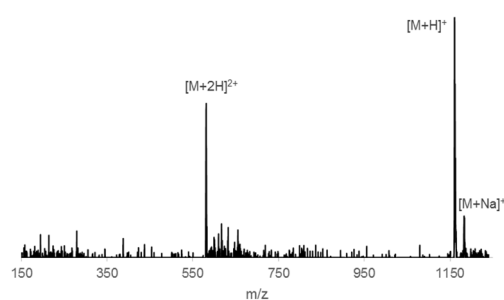
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1215.3111 und m/z für $[M+H]^+$ gef. 1194.4047.

AcNH-C-[Pra-Nea]-VYC^{CONH2} **cP-A16**

UPLC-MS t_R = 1.61 und 1.81 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

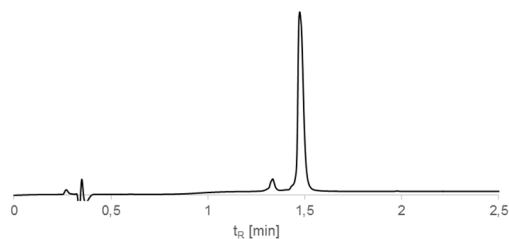


m/z für $[M+Na]^+$ gef. 1183.3; m/z für $[M+H]^+$ gef. 1160.5 und m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 580.8.

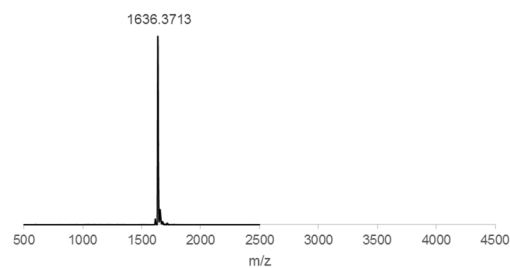
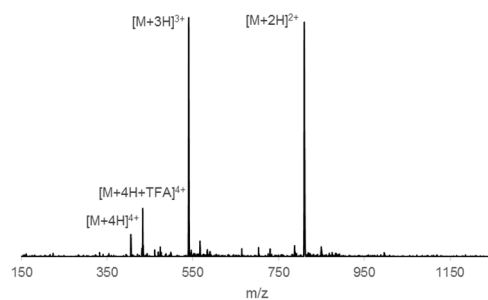
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1177.6258.

AcNH-CY[Pra-Neo]HKC^{CONH2} **cP-A17**

UPLC-MS t_R = 1.47 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

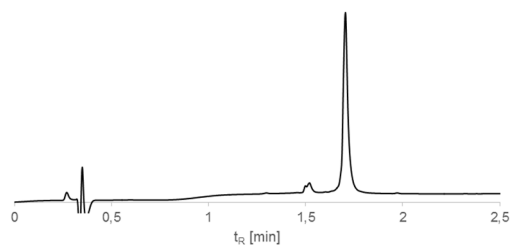


m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 809.8; m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 540.8; m/z für $[M+4H+TFA]^{4+}$ gef. 433.2 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ 406.6.

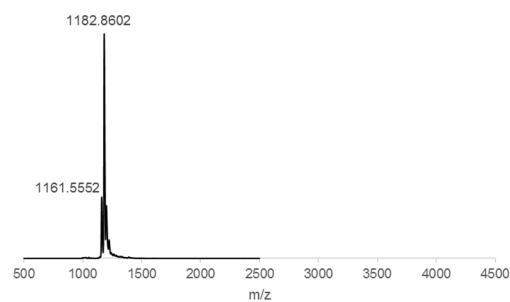
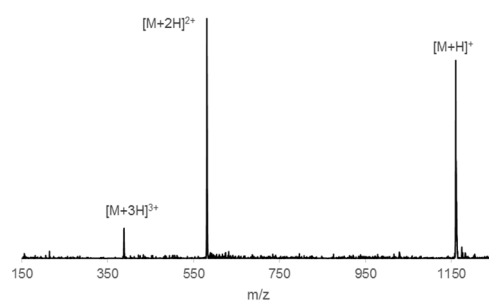
m/z für $[M+H+H_2O]^+$ gef. 1636.3713.

AcNHC[Pra-Nea]VYCCONH₂ **cP-A18**

UPLC-MS $t_R = 1.70$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

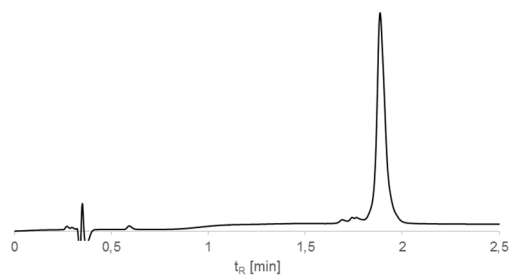


m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 1160.5; m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 580.9 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ gef. 387.4.

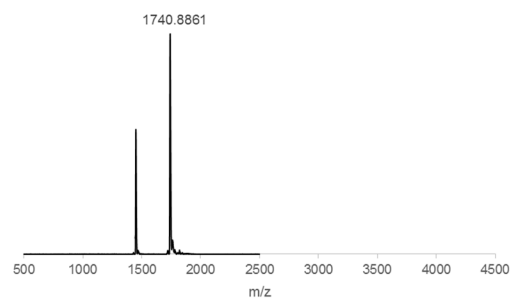
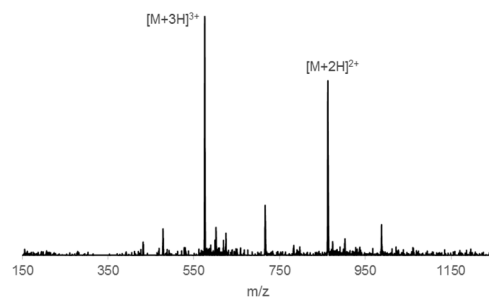
m/z für $[M+Na]^+$ gef. 1182.8602 und m/z für $[M+H]^+$ gef. 1161.5552.

AcNHCSW[Pra-Neo]YPCCONH₂ **cP-A19**

UPLC-MS $t_R = 1.88$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

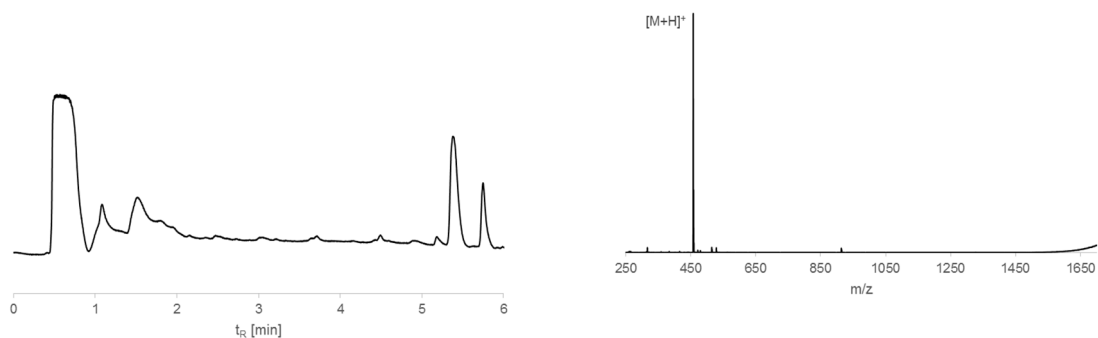


m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 863.3 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 575.3.

m/z für $[M+Na]^+$ gef. 1740.8861.

AcNHV-Har-AG^{CONH2} **gP21**

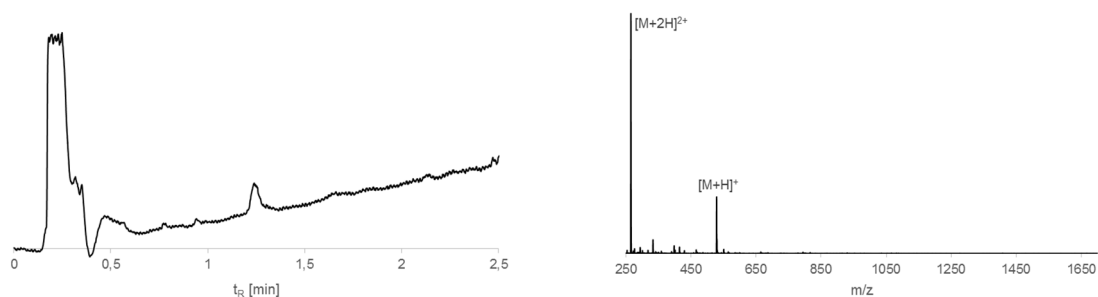
UPLC-MS $t_R = 1.52$ min (3 – 40 % in 5 min, 225 nm)



m/z für $[M+H]^+$ gef. 457.3.

AcNHHar-A-Har-G^{CONH2} **gP23**

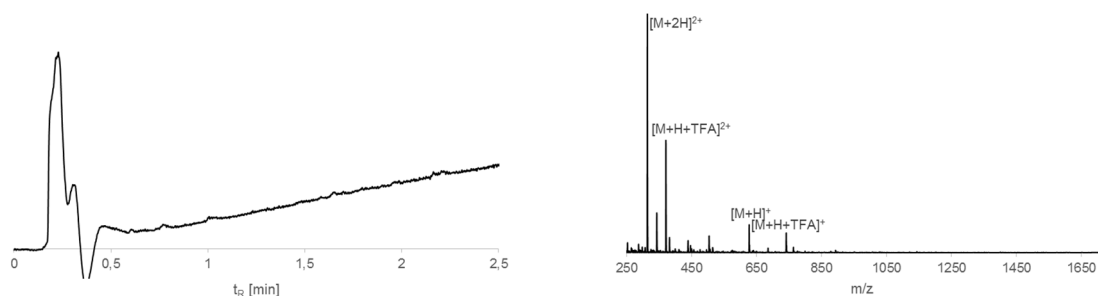
UPLC-MS $t_R = 1.25$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 225 nm)



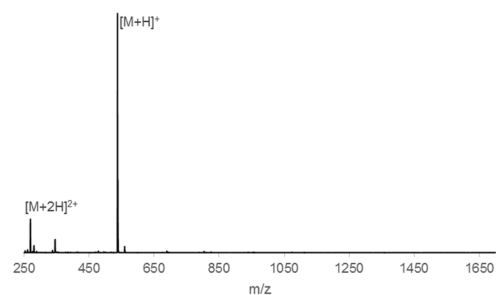
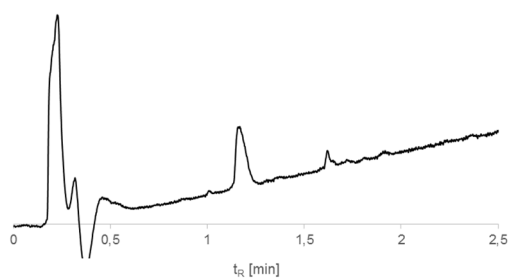
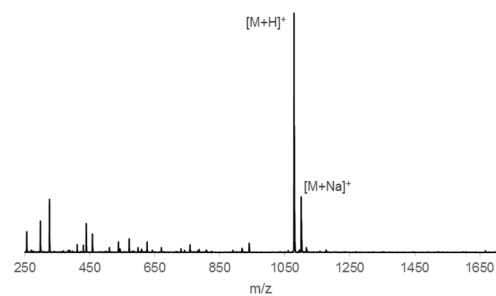
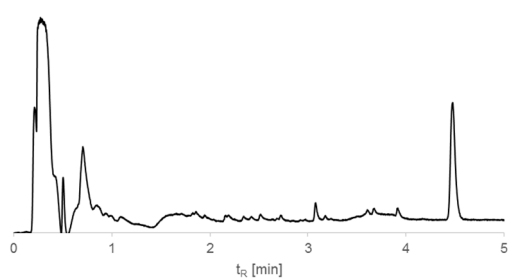
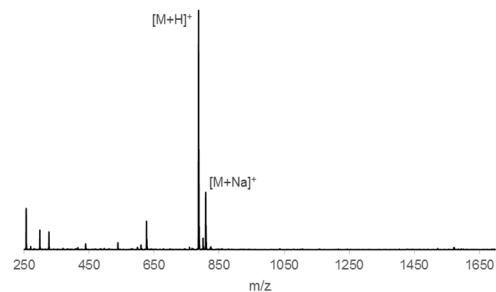
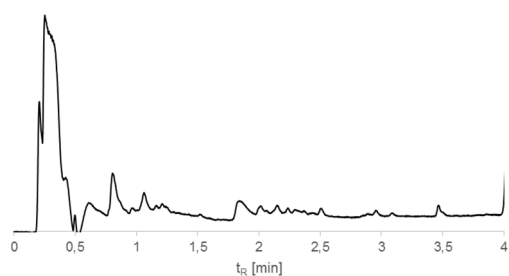
m/z für $[M+H]^+$ gef. 528.4 und m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 264.9.

AcNHHar-Har-Har-G^{CONH2} **gP24**

UPLC-MS $t_R = 0.31$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 225 nm)

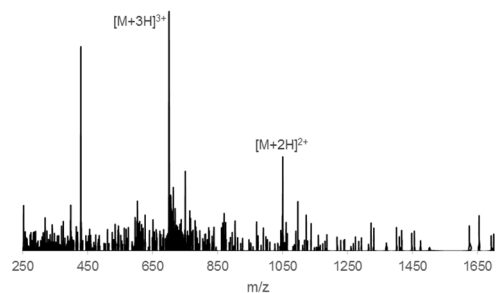
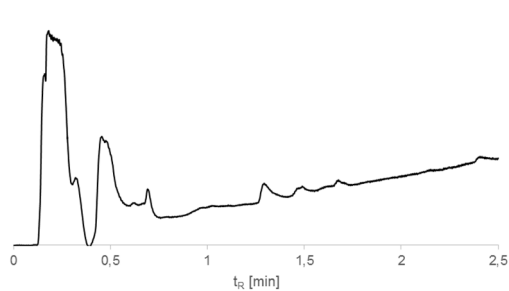


m/z für $[M+H+TFA]^+$ gef. 741.6; m/z für $[M+H]^+$ gef. 627.2; m/z für $[M+2H+TFA]^{2+}$ gef. 371.5 und m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 314.6.

AcNHHar-PPL^{CONH2} **gP25**UPLC-MS $t_R = 1.16$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 225 nm) m/z für $[M+H]^+$ gef. 537.2 und m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 269.7.AcNH[Pra-Neo]LVA^{CONH2} **P-A26**UPLC-MS $t_R = 0.75$ min (3 – 40 % in 5 min, 225 nm) m/z für $[M+Na]^+$ gef. 1100.6 und m/z für $[M+H]^+$ gef. 1078.5.AcNH[Pra-Nea]LVA^{CONH2} **P-A27**UPLC-MS $t_R = 0.90$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm) m/z für $[M+Na]^+$ gef. 808.2 und m/z für $[M+H]^+$ gef. 786.4.

AcNH₂agagG[Pra-Neo]GG^{CONH₂} **PPO-A28**

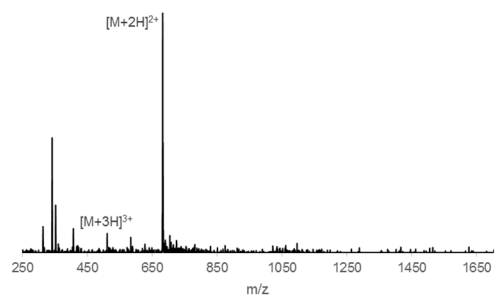
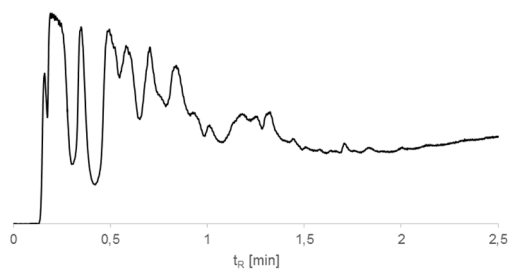
UPLC-MS $t_R = 0.52$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 225 nm)



m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 1050.5 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 700.3.

AcNH[Pra-Neo]GGagag^{CONH₂} **PPO-A29**

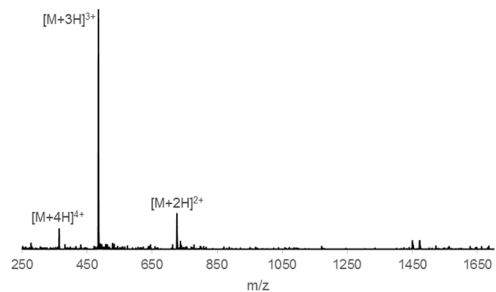
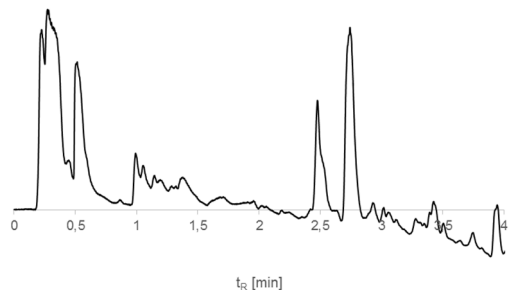
UPLC-MS $t_R = 0.55$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 225 nm)



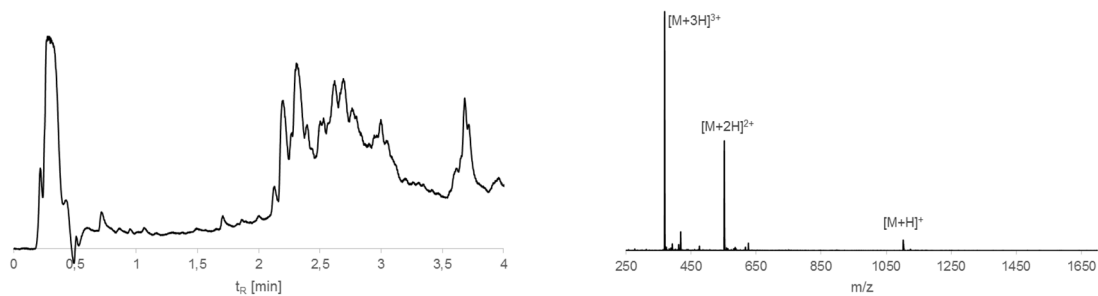
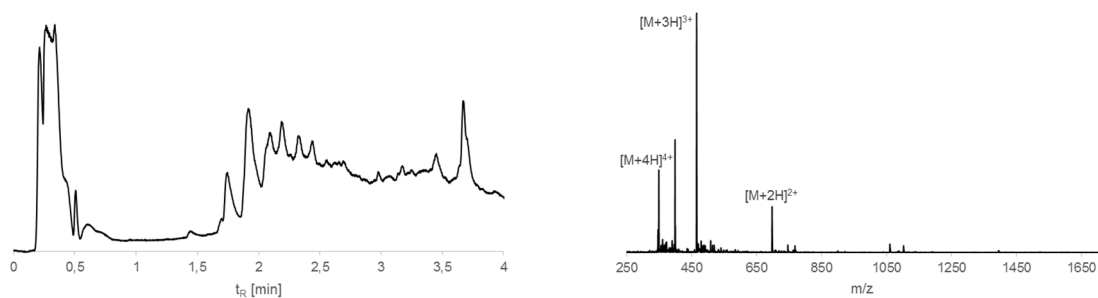
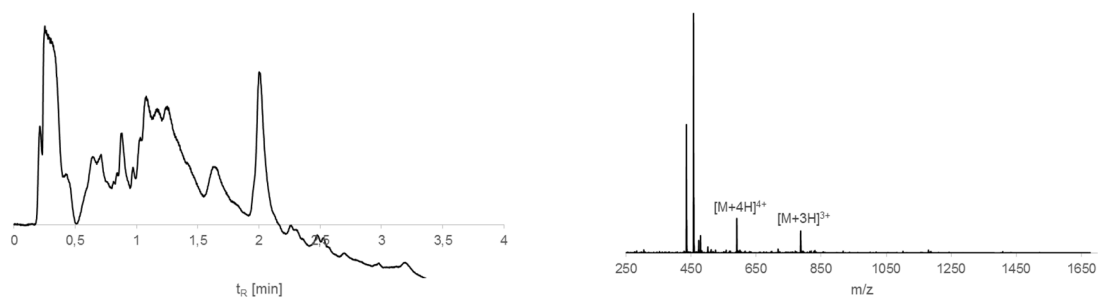
m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 682.3 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 511.3.

AcNHCY[Pra-Neo]PC^{CONH₂} **cP-A30**

UPLC-MS $t_R = 1.07$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm)

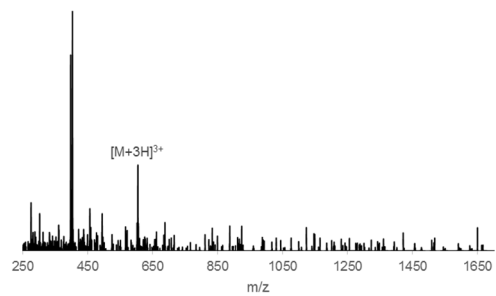
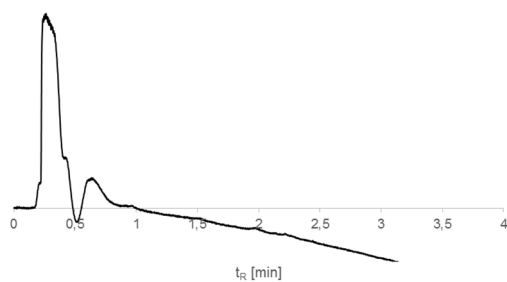


m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 726.1; m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 483.8 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ gef. 363.6.

FAMNH[Pra-Nea]LVA^{CONH2} **P-A33**UPLC-MS $t_R = 2.36$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm) m/z für $[M+H]^+$ gef. 1102.3; m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 552.4 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 368.1.FAMNH[Pra-Neo]LVA^{CONH2} **P-A34**UPLC-MS $t_R = 1.97$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm) m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 697.7; m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 465.6 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ gef. 349.7.FAMNH[Pra-Neo]GGagag^{CONH2} **PPO-A35**UPLC-MS $t_R = 1.07$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm) m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 787.6 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ gef. 590.6.

FAMNH^{agag}GG[Pra-Neo]G^{CONH2} **PPO-A36**

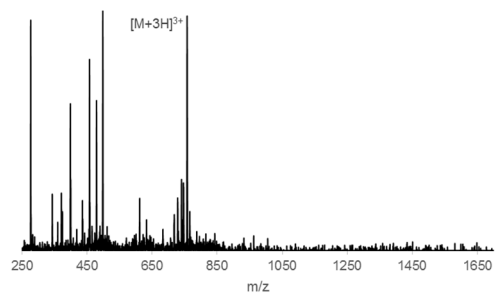
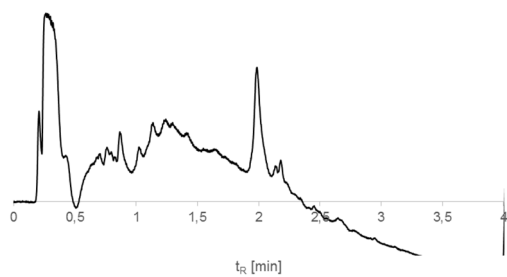
UPLC-MS $t_R = 0.52$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm)



m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 605.3.

FAMNH[Pra-Neo]GGtcac^{CONH2} **PPO-A37**

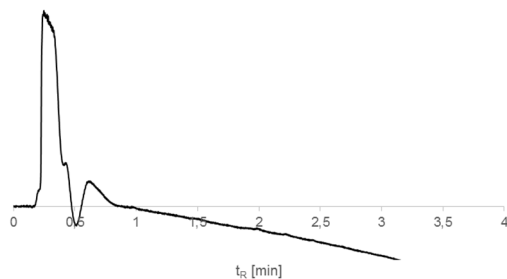
UPLC-MS $t_R = 1.05$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm)



m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 757.8.

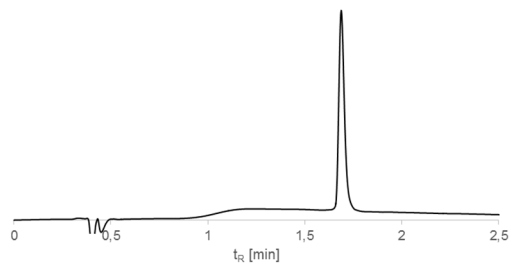
FAMNH^{tcac}GG[Pra-Neo]G^{CONH2} **PPO-A38**

UPLC-MS $t_R = 0.55$ min (3 – 40 % in 4 min, 225 nm)

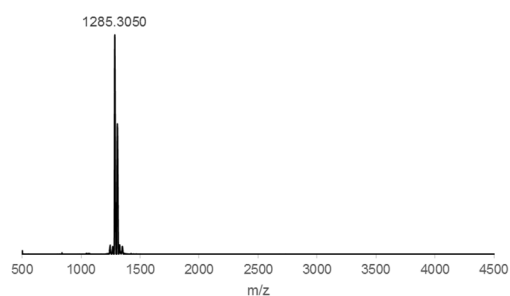
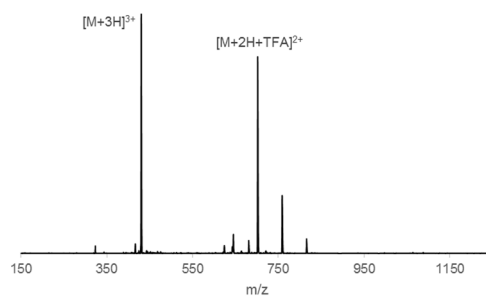


AcNH[Pra-Neo(Gua)₅]LVA^{CONH2} **P-gA26**

UPLC-MS t_R = 1.69 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

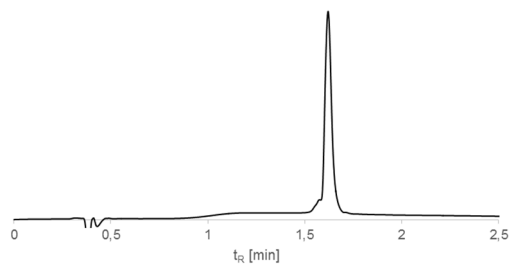


m/z für $[M+2H+TFA]^{2+}$ gef. 702.2 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 430.3.

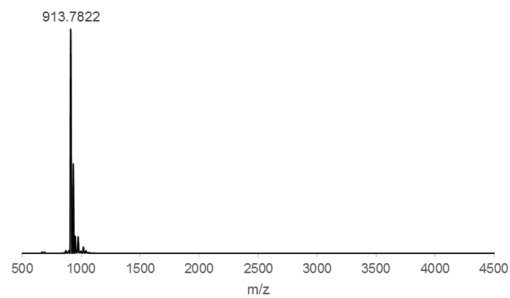
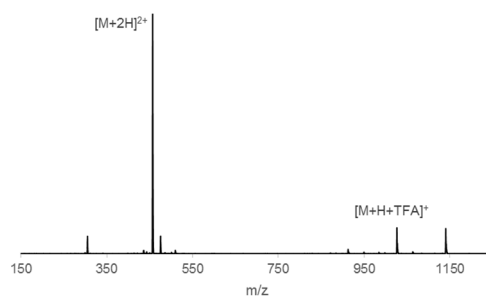
m/z für $[M+H]^+$ gef. 1285.3050.

AcNH[Pra-Nea(Gua)₃]LVA^{CONH2} **P-gA27**

UPLC-MS t_R = 1.62 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

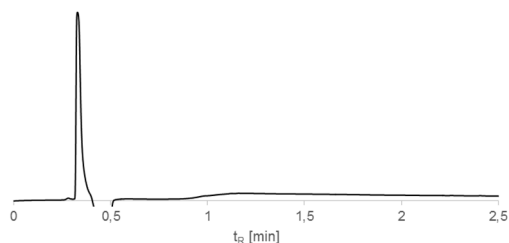


m/z für $[M+H+TFA]^+$ gef. 1026.8 und m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 456.7.

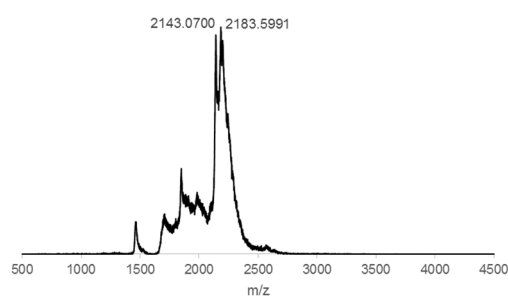
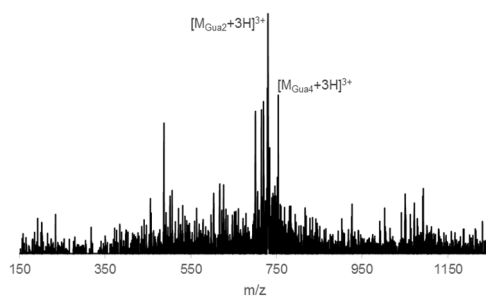
m/z für $[M+H]^+$ gef. 913.7822.

AcNH₂agagG[Pra-Neo(Gua)₂]GG^{CONH₂} **PPO-gA28**

UPLC-MS $t_R = 0.33$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

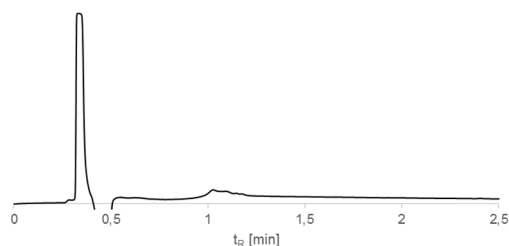


m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 754.1 und m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 729.9.

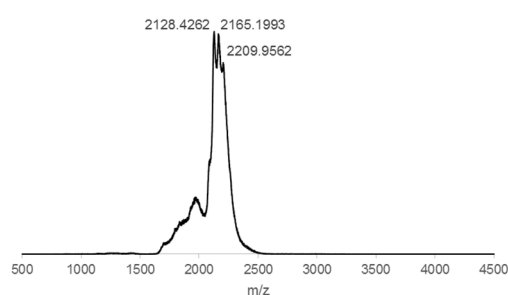
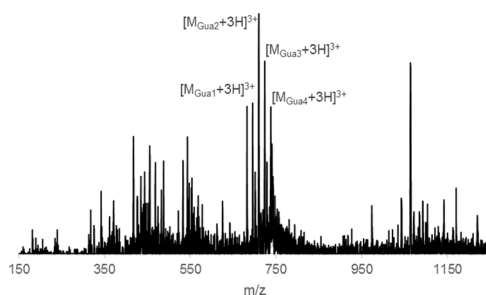
m/z für $[M_{Gua2}+H]^+$ gef. 2183.5991 und m/z für $[M_{Gua1}+H]^+$ gef. 2143.0700.

AcNH₂[Pra-Neo(Gua)₃]GGagag^{CONH₂} **PPO-gA29**

UPLC-MS $t_R = 0.34$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

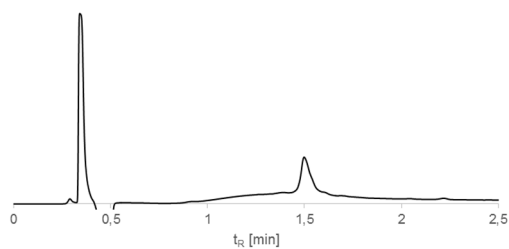


m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 737.8; m/z für $[M_{Gua3}+3H]^{3+}$ gef. 723.5; m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 709.9 und m/z für $[M_{Gua1}+3H]^{3+}$ gef. 695.3.

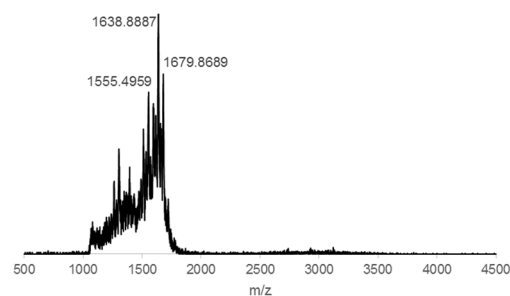
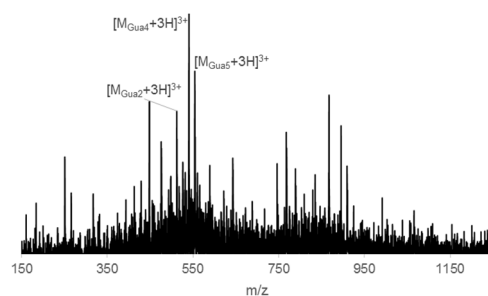
m/z für $[M_{Gua4}+H]^+$ gef. 2209.5879; m/z für $[M_{Gua3}+H]^+$ gef. 2165.1993 und m/z für $[M_{Gua2}+H]^+$ gef. 2128.4262.

AcNHCY[Pra-Neo(Gua)₄]PCCONH₂ **cP-gA30**

UPLC-MS $t_R = 1.50$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

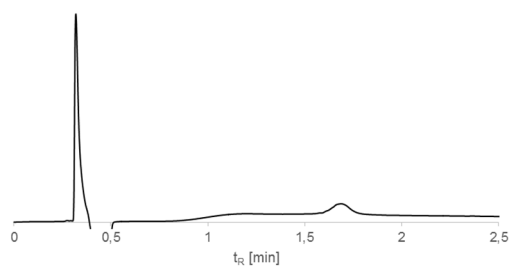


m/z für $[M_{Gua5}+3H]^{3+}$ gef. 554.8; m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 540.8; und m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 512.2.

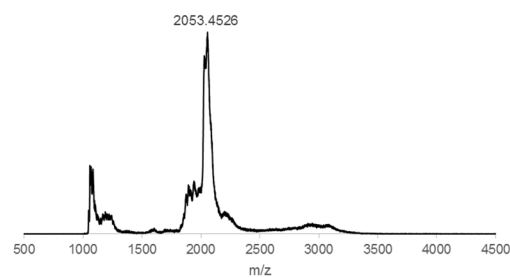
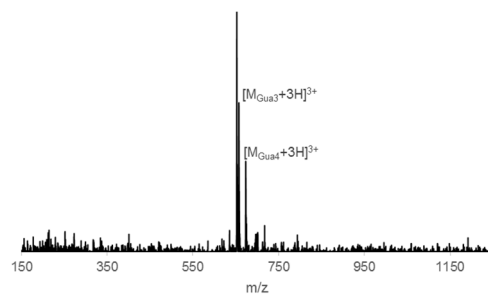
m/z für $[M_{Gua5}+Na]^+$ gef. 1679.8689; m/z für $[M_{Gua4}+Na]^+$ gef. 1638.8887 und m/z für $[M_{Gua2}+Na]^+$ gef. 1555.4959.

AcNHCHRIS[Pra-Neo(Gua)₃]YCCONH₂ **cP-gA31**

UPLC-MS $t_R = 1.70$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

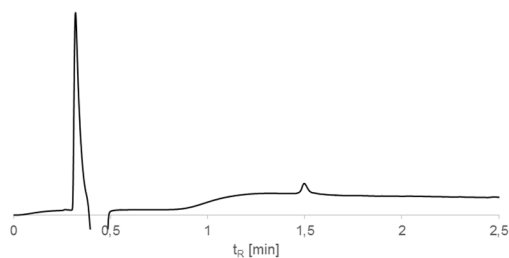


m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 672.1 und m/z für $[M_{Gua3}+3H]^{3+}$ gef. 658.2.

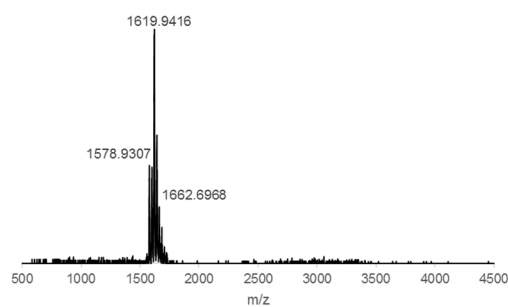
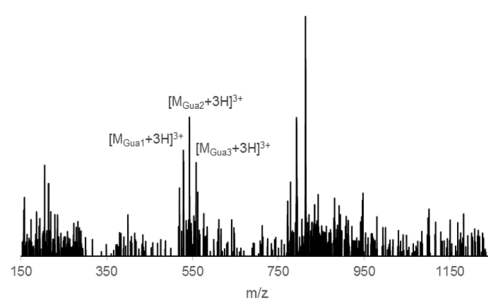
m/z für $[M_{Gua5}+H]^+$ gef. 2053.4526.

AcNHC[Pra-Neo(Gua)₂]YTSC^{CONH2} **cP-gA32**

UPLC-MS $t_R = 1.50$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

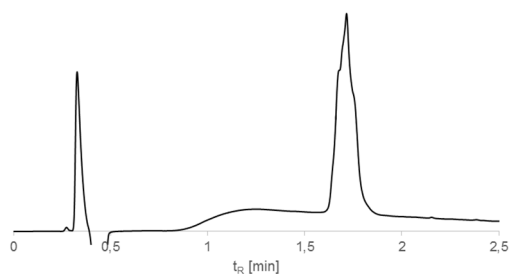


m/z für $[M_{Gua3}+3H]^{3+}$ gef. 558.4; m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 542.8 und m/z für $[M_{Gua1}+3H]^{3+}$ gef. 529.3.

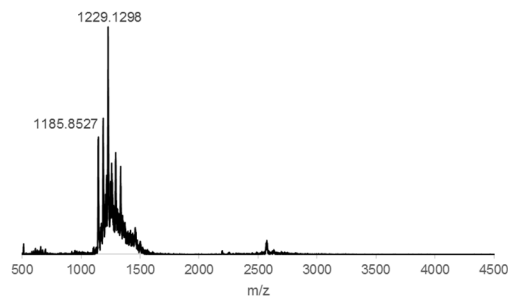
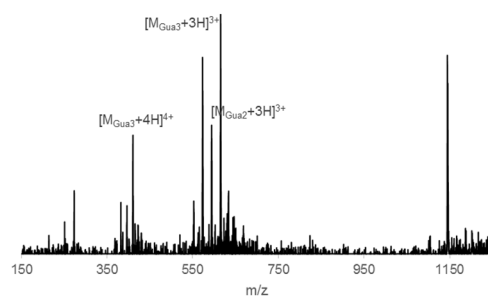
m/z für $[M_{Gua3}+H]^+$ gef. 1662.6968; m/z für $[M_{Gua2}+H]^+$ gef. 1625.6427 und m/z für $[M_{Gua1}+H]^+$ gef. 1578.9307.

FAMNH[Pra-Nea(Gua)₂₋₃]LVA^{CONH2} **P-gA33**

UPLC-MS $t_R = 1.71$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)

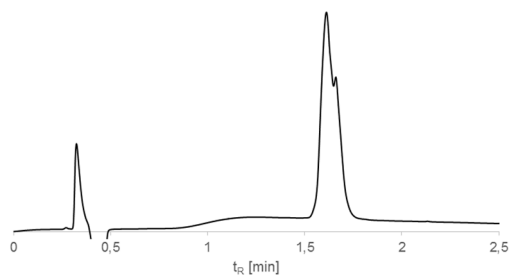


MALDI-TOF

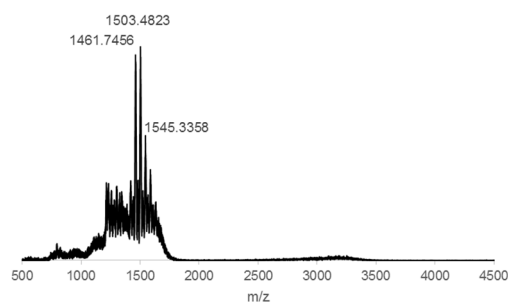
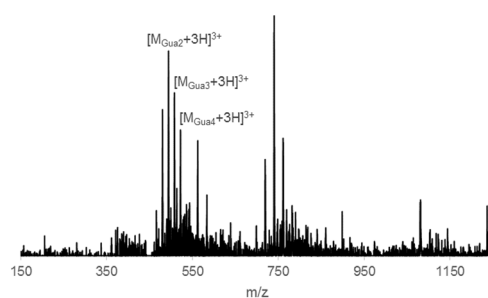
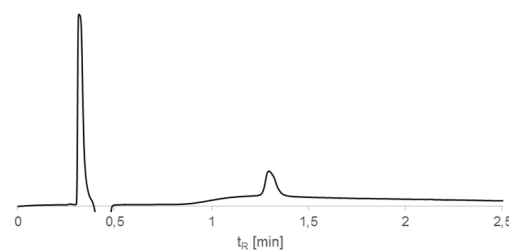


m/z für $[M_{Gua3}+3H]^{3+}$ gef. 615.2; m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 594.1 und m/z für $[M_{Gua3}+4H]^{4+}$ gef. 410.4.

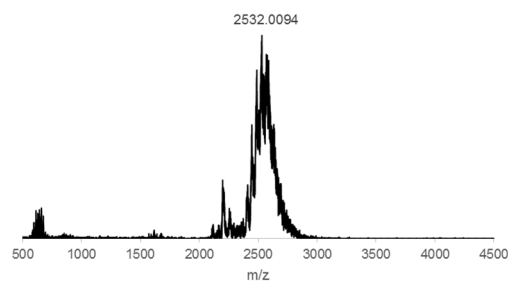
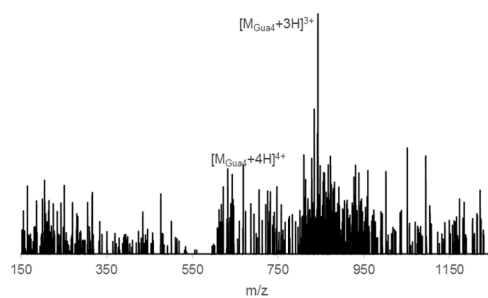
m/z für $[M_{Gua3}+H]^+$ gef. 1229.1298 und m/z für $[M_{Gua2}+H]^+$ gef. 1185.8527.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₂₋₄]LVA^{CONH₂} **P-gA34**UPLC-MS t_R = 1.61 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)

MALDI-TOF

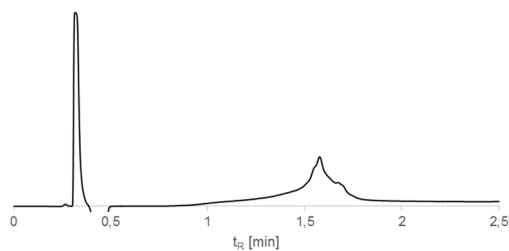
 m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 522.0; m/z für $[M_{Gua3}+3H]^{3+}$ gef. 507.6 und m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 493.9. m/z für $[M_{Gua4}+H]^+$ gef. 1545.3358; m/z für $[M_{Gua3}+H]^+$ gef. 1503.4823 und m/z für $[M_{Gua2}+H]^+$ gef. 1461.7456.FAMNH[Pra-Neo(Gua)₄]GGagag^{CONH₂} **PPO-gA35**UPLC-MS t_R = 1.30 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)

MALDI-TOF

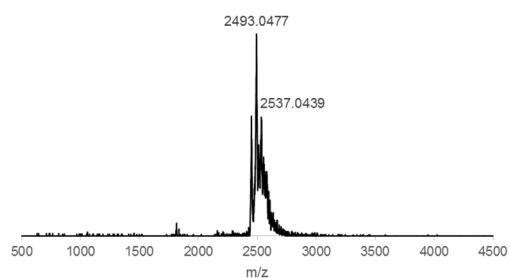
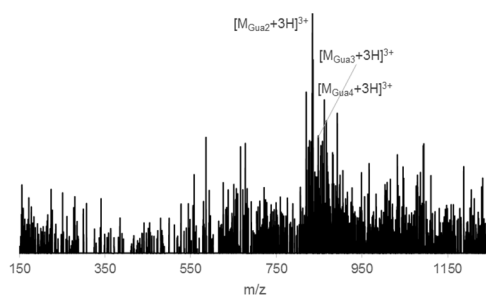
 m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 843.1 und m/z für $[M_{Gua4}+4H]^{4+}$ gef. 632.4. m/z für $[M_{Gua4}+H]^+$ gef. 2532.0094.

FAMNH₂agagGG[Pra-Neo(Gua)₃]G^{CONH₂} **PPO-gA36**

UPLC-MS $t_R = 1.58$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

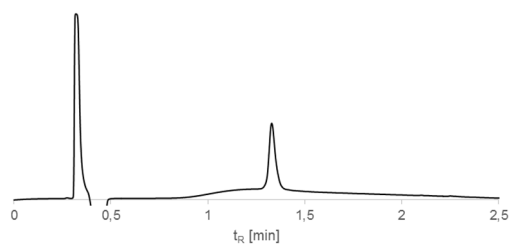


m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 862.6; m/z für $[M_{Gua3}+3H]^{3+}$ gef. 847.6 und m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 834.4.

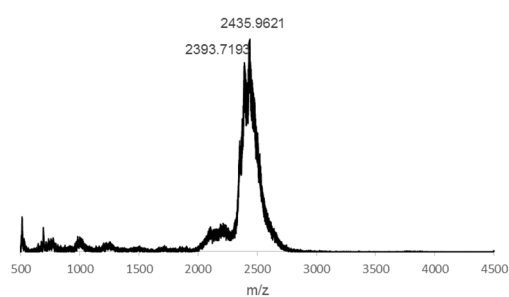
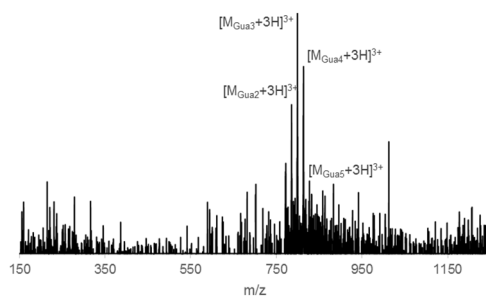
m/z für $[M_{Gua3}+H]^+$ gef. 2537.0439 und m/z für $[M_{Gua2}+H]^+$ gef. 2493.0477.

FAMNH₂[Pra-Neo(Gua)₂₋₅]GGtcac^{CONH₂} **PPO-gA37**

UPLC-MS $t_R = 1.33$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

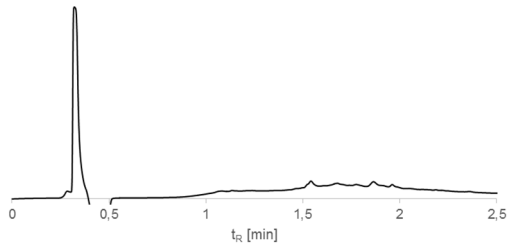


m/z für $[M_{Gua5}+3H]^{3+}$ gef. 827.2; m/z für $[M_{Gua4}+3H]^{3+}$ gef. 813.5; m/z für $[M_{Gua3}+3H]^{3+}$ gef. 799.2 und m/z für $[M_{Gua2}+3H]^{3+}$ gef. 785.5.

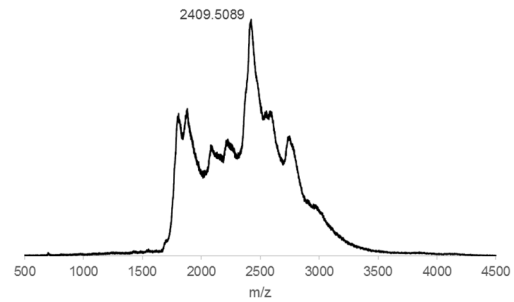
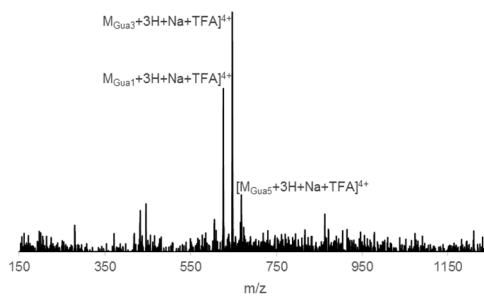
m/z für $[M_{Gua4}+H]^+$ gef. 2435.9621 und m/z für $[M_{Gua3}+H]^+$ gef. 2393.7193.

FAMNH⁺tcacGG[Pra-Neo(Gua)₄]G^{CONH2} **PPO-gA38**

UPLC-MS $t_R = 1.56$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

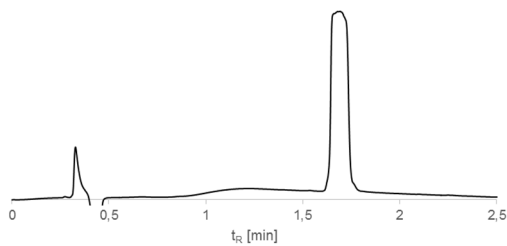


m/z für $[M_{Gua5}+3H+Na+TFA)^{4+}$ gef. 668.7; m/z für $[M_{Gua3}+3H+Na+TFA)^{4+}$ gef. 649.9 und m/z für $[M_{Gua1}+3H+Na+TFA)^{4+}$ gef. 626.1.

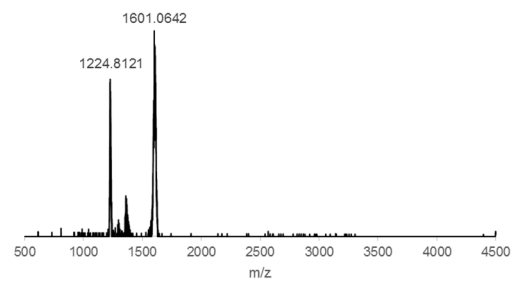
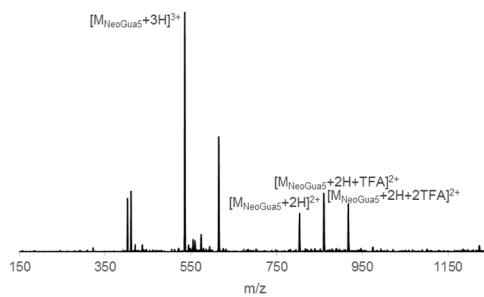
m/z für $[M_{Gua2}+H]^+$ gef. 2409.5089.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₅]LVA^{CONH2} **P-gA39**

UPLC-MS $t_R = 1.70$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

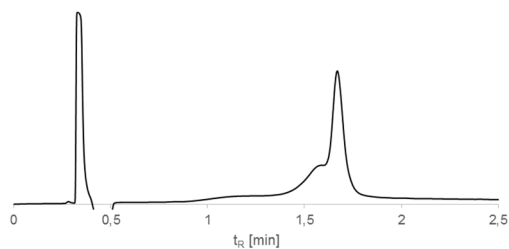


m/z für $[M_{NeoGua5}+2H+2TFA)^{2+}$ gef. 917.1; m/z für $[M_{NeoGua5}+2H+TFA)^{2+}$ gef. 860.6; m/z für $[M_{NeoGua5}+2H]^{2+}$ gef. 803.7; und m/z für $[M_{NeoGua5}+3H]^{3+}$ gef. 536.0.

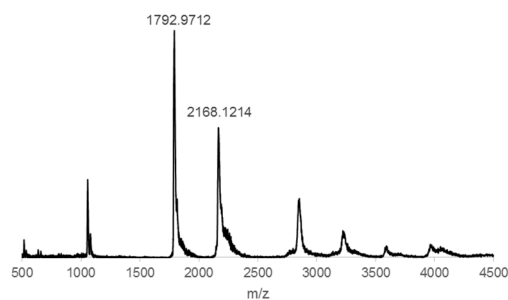
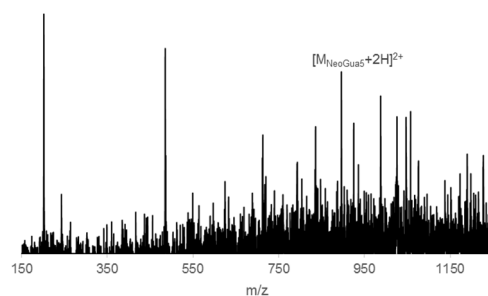
m/z für $[M_{NeoGua5}+H]^+$ gef. 1601.0642 und m/z für $[M_{NeoGua3}+H]^+$ gef. 1224.8121.

FAMNH[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]CHRISSY^{CONH2} **P-gA40**

UPLC-MS t_R = 1.67 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

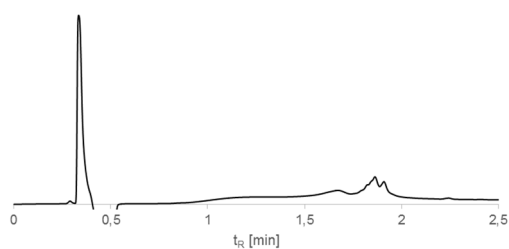


m/z für $[M_{NeoGua5}+2H]^{2+}$ gef. 896.2.

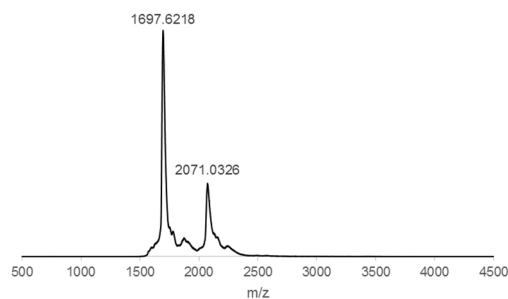
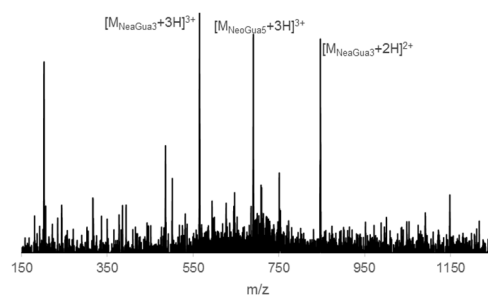
m/z für $[M_{NeoGua5}+H]^+$ gef. 2168.1214 und m/z für $[M_{NeoGua3}+H]^+$ gef. 1792.9712.

FAMNH[C][Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]YTSC^{CONH2} **P-gA41**

UPLC-MS t_R = 0.33 und 1.87 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

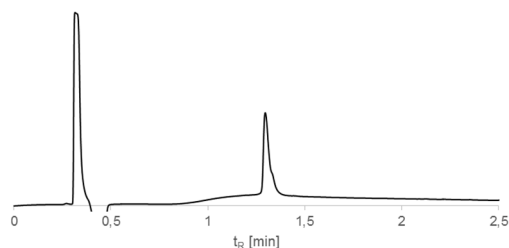


m/z für $[M_{NeoGua3}+2H]^{2+}$ gef. 846.8; m/z für $[M_{NeoGua5}+3H]^{3+}$ gef. 690.3 und m/z für $[M_{NeoGua3}+3H]^{3+}$ gef. 564.9.

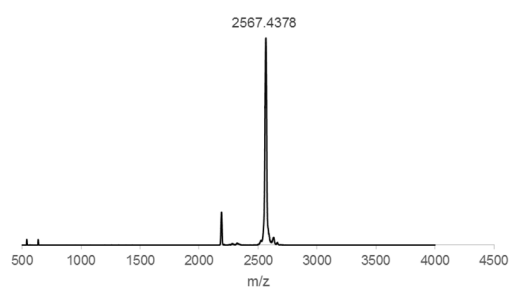
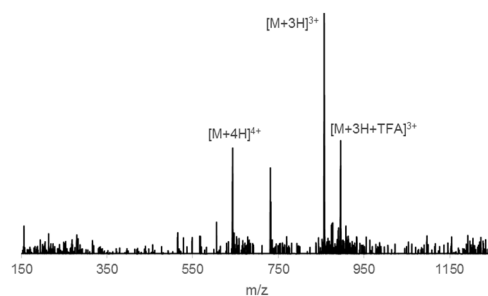
m/z für $[M_{NeoGua5}+H]^+$ gef. 2071.0326 und m/z für $[M_{NeoGua3}+H]^+$ gef. 1697.6218.

FAMNH[Pra-Neo(Gua)₅]GGagag^{CONH₂} **PPO-gA42 Neomycin**

UPLC-MS t_R = 1.29 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

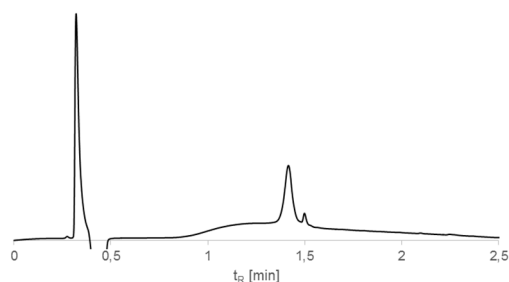


m/z für $[M+3H+TFA]^{3+}$ gef. 895.4; m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 856.9 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ gef. 643.2.

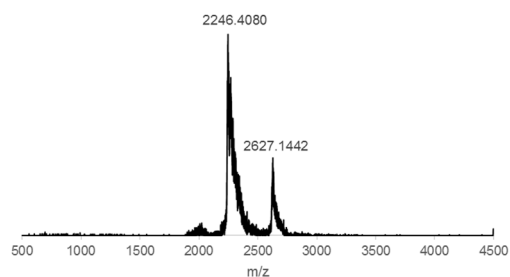
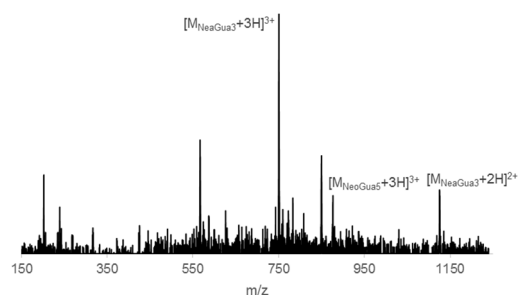
m/z für $[M+H]^+$ gef. 2567.4378.

FAMNHagagGG[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]G^{CONH₂} **PPO-gA43**

UPLC-MS t_R = 1.53 min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

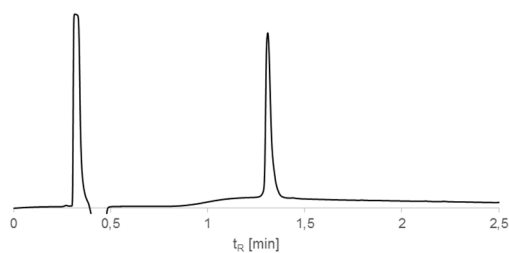


m/z für $[M_{NeoGua3}+2H]^{2+}$ gef. 1124.9; m/z für $[M_{NeoGua5}+3H]^{3+}$ gef. 876.2; m/z für $[M_{NeoGua3}+3H]^{3+}$ gef. 750.5 und $[M_{NeoGua5}+4H]^{4+}$ gef. 657.9.

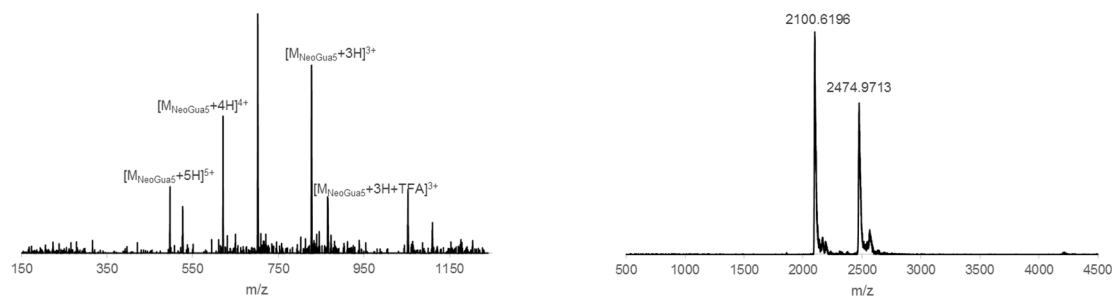
m/z für $[M_{NeoGua5}+H]^+$ gef. 2627.1442 und m/z für $[M_{NeoGua3}+H]^+$ gef. 2246.4080.

FAMNH[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]GGtcac^{CONH₂} **PPO-gA44**

UPLC-MS $t_R = 1.31$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

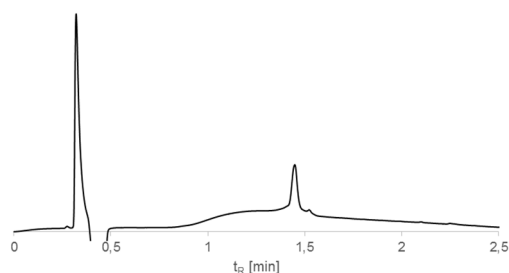


m/z für $[M_{NeoGua5}+3H+TFA]^{3+}$ gef. 865.5; m/z für $[M_{NeoGua5}+3H]^{3+}$ gef. 865.5; m/z für $[M_{NeoGua5}+4H]^{4+}$ gef. 621.5 und $[M_{NeoGua5}+5H]^{5+}$ gef. 497.0.

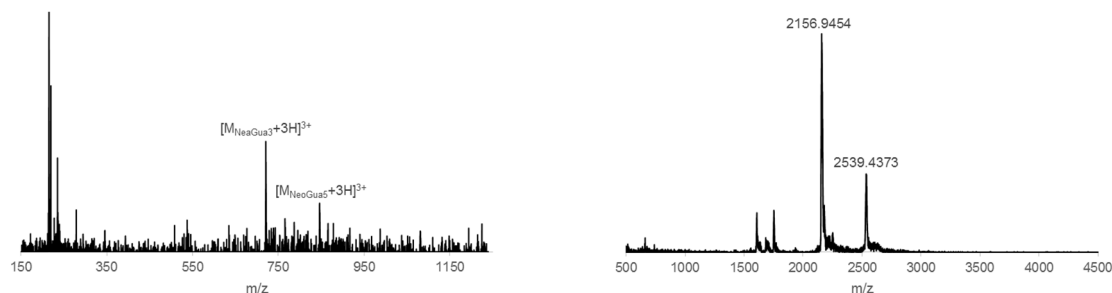
m/z für $[M_{NeoGua5}+H]^+$ gef. 2474.9713 und m/z für $[M_{NeoGua3}+H]^+$ gef. 2100.6196.

FAMNHtcacGG[Pra-Nea(Gua)₃/Neo(Gua)₅]G^{CONH₂} **PPO-gA45**

UPLC-MS $t_R = 1.45$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF

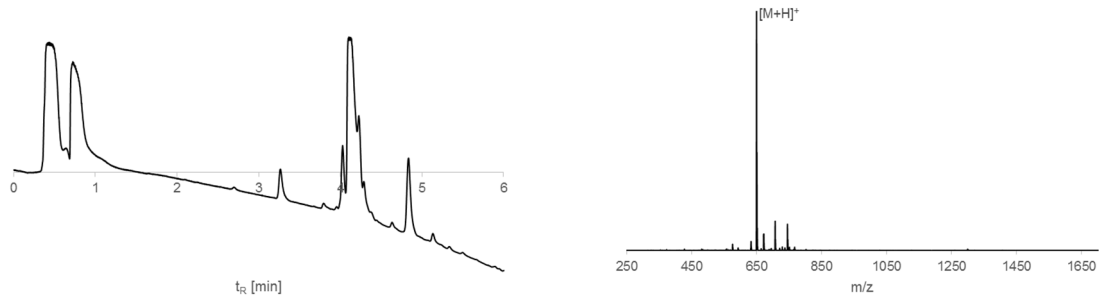


m/z für $[M_{NeoGua5}+3H]^{3+}$ gef. 846.5 und m/z für $[M_{NeoGua3}+3H]^{3+}$ gef. 720.8.

m/z für $[M_{NeoGua5}+H]^+$ gef. 2539.4373 und m/z für $[M_{NeoGua3}+H]^+$ gef. 2156.9454.

FmocHN⁺GGGS-Pra-G^{CONH2}/FmocHN⁺GGGS-Pra-G^{Rink-Amid-PEG-Harz} **Spacer**

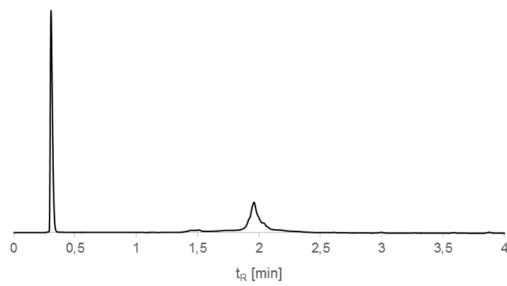
UPLC-MS $t_R = 4.12$ min (3 – 60 % in 6 min, 225 nm)



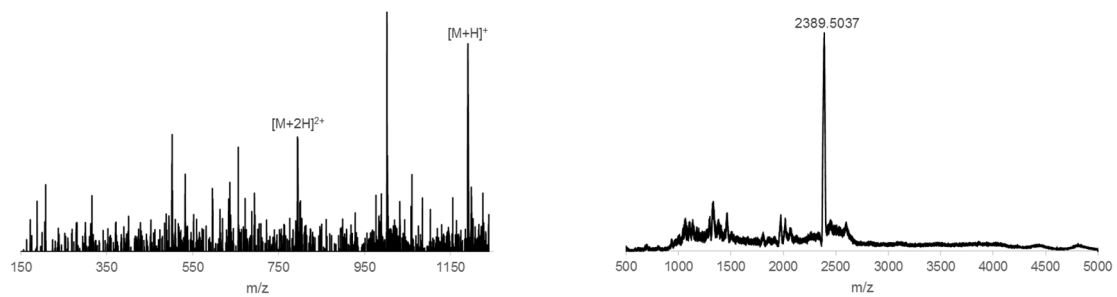
m/z für $[M+H]^+$ gef. 650.2.

H₂N⁺YHDPNRKCCYAAGGGS[Pra-(Fam-Azid)]G^{CONH2} **P46**

UPLC-MS $t_R = 1.96$ min (3 – 80 % in 4 min, 210 nm)



MALDI-TOF

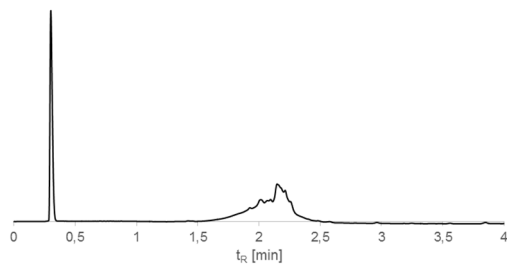


m/z für $[M+H]^{2+}$ gef. 1190.9 und m/z für $[M+2H]^{3+}$ gef. 794.7.

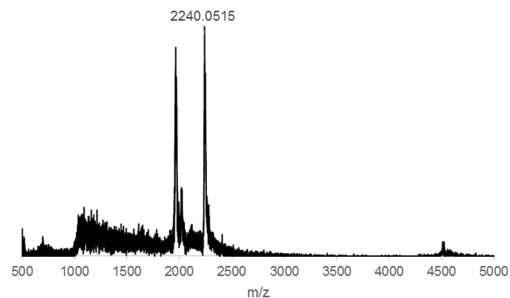
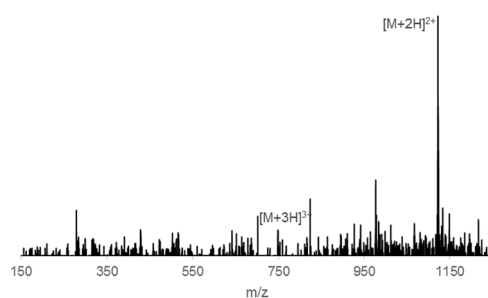
m/z für $[M+H]^+$ gef. 2389.5037.

$\text{H}_2\text{N}^+\text{KCCYSAPVETAMGGGS}[\text{Pra}-(\text{Fam-Azid})]\text{G}^{\text{CONH}_2}$ **P47**

UPLC-MS $t_R = 2.14$ min (3 – 80 % in 4 min, 210 nm)



MALDI-TOF

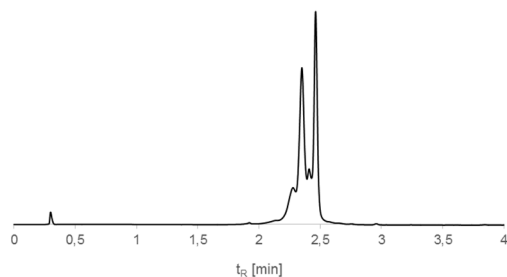


m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 1121.9 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 748.5.

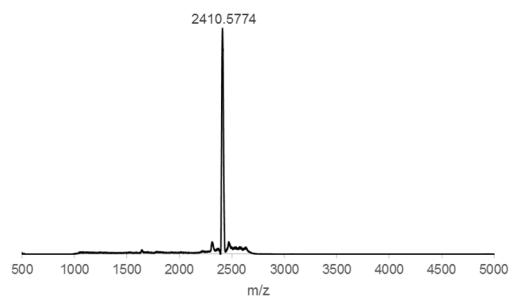
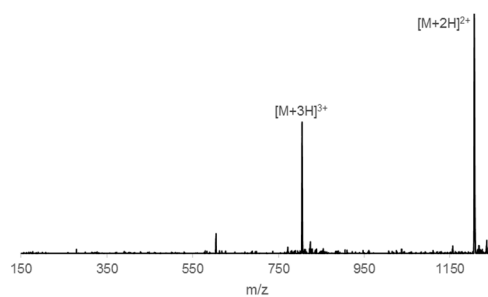
m/z für $[M+H]^+$ gef. 2240.0515.

$\text{H}_2\text{N}^+\text{KVVTVDWLLLQRGGGS}[\text{Pra}-(\text{Fam-Azid})]\text{G}^{\text{CONH}_2}$ **P48**

UPLC-MS $t_R = 2.41$ min (3 – 80 % in 4 min, 210 nm)



MALDI-TOF

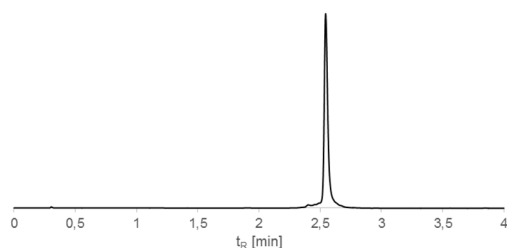


m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 1206.8 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 804.9.

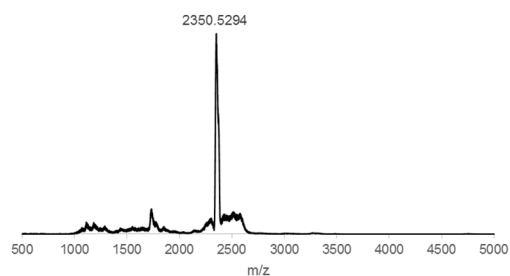
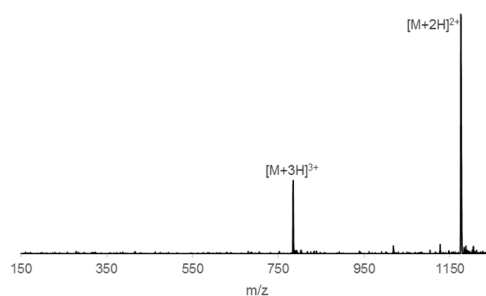
m/z für $[M+H]^+$ gef. 2410.5774.

$\text{H}_2\text{N}^+\text{KVWVIPSNTAFGGGS}[\text{Pra}-(\text{Fam-Azid})]\text{G}^{\text{CONH}_2}$ **P49**

UPLC-MS $t_R = 2.41$ min (3 – 80 % in 4 min, 210 nm)



MALDI-TOF

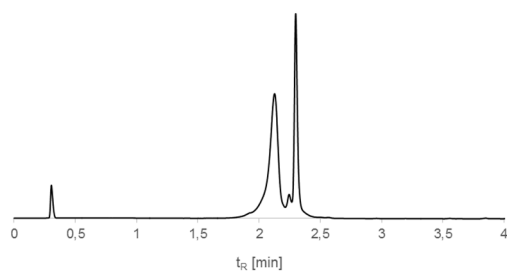


m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 1176.29 und m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 784.6.

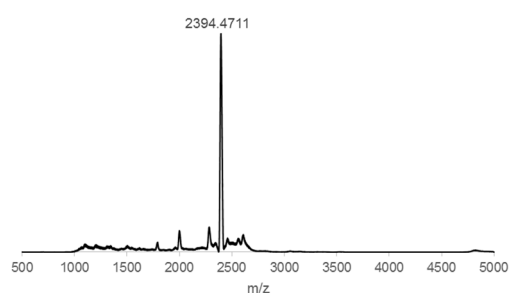
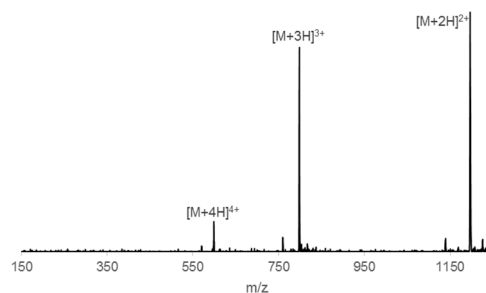
m/z für $[M+H]^+$ gef. 2350.5294.

$\text{H}_2\text{N}^+\text{DPILPKKLWIVKGGGS}[\text{Pra}-(\text{Fam-Azid})]\text{G}^{\text{CONH}_2}$ **P50**

UPLC-MS $t_R = 1.45$ min (3 – 40 % in 2.5 min, 210 nm)



MALDI-TOF



m/z für $[M+2H]^{2+}$ gef. 1196.8; m/z für $[M+3H]^{3+}$ gef. 798.3 und m/z für $[M+4H]^{4+}$ gef. 599.0.

m/z für $[M+H]^+$ gef. 2394.4711.

Publikationen

„*Perspectives in targeting miRNA function*“ C. Schöniger, C. Arenz, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 6115-6118.

Poster, VI. Nucleinsäurechemie-Treffen der Deutschen Nukleinsäurechemie Gemeinschaft, Greifswald 2013.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Christoph Arenz für das interessante und herausfordernde Thema und dass ich diesen Weg in diesem Arbeitskreis beginnend mit dem Forschungspraktikum gehen durfte.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Oliver Seitz für die Nutzung der zahlreichen Messgeräte. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Katharina Pfaff und Frau Angela Thiesies aus dem NMR-Service bedanken für das stets schnelle Messen und bei Frau Angelika Woyda aus dem MS-Service.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Claudine M. Dojahn, ohne sie ich wahrscheinlich nicht hier wäre. Sehr dankbar bin ich allen Mitgliedern aus dieser Arbeitsgruppe, das Teamgefühl was vermittelt wurde, gleicht einer Familie. Vielen Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen und nicht ganz so wissenschaftlichen Gespräche, die aufopfernde Hilfe und dem Lächeln, welches auch an schlechten Tagen entgegengebracht wurde. Insbesondere bin ich Alexandra Klose-Stier dankbar. Wir sind diesen Weg gemeinsam seit 2006 gegangen und haben viel Freude und Leid geteilt. Aber auch Christian Kimmich, Essa Saied, Fabian Voigt und Thomas Pinkert bin ich sehr dankbar. Bei Christian und Fabian bedanke ich mich nochmal für das Lesen meiner Dissertation.

Ich bedanke mich auch bei meinen Eltern, die mich stets meinen Weg gingen ließen.

Tiefster Dank gilt Johannes Förtsch, der immer für mich da ist. Mit Dir habe ich jede Emotion geteilt, ob Freude oder Trauer, ob Euphorie oder Wut. Egal wie der Tag auch war, Du bist da für mich.